

**Der mittlere Aktivitätskoeffizient von
Alkalichloriden in konzentrierten
Rinderhämoglobinlösungen**

von

Max-Emanuel Bauer

aus

Augsburg

Aus dem Institut für Radiologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. nat. H. Pauly

Der mittlere Aktivitätskoeffizient von Alkalichloriden in konzentrierten Rinderhämoglobinlösungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich - Alexander - Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt
von
Max-Emanuel Bauer
aus
Augsburg

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan:

Prof.Dr.E.Rügheimer

Referent:

Prof.Dr.Dr.H.Pauly

Tag der mündlichen Prüfung:

14.April 1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548222_0013

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung und Problemstellung	1
2.	Methodik	6
2.1	Theorie der Messung	6
2.1.1	Die EMK einer elektrochemischen Meßzelle mit Membranelektroden	6
2.1.2	Bestimmung der mittleren Aktivität	14
2.2	Herstellung der Hämoglobinlösung	15
2.2.1	Hämoglobin-Stammlösung	15
2.2.2	Entsalzen der Hämoglobin-Stammlösung	17
2.2.3	Aufkonzentration der Hämoglobin-Stammlösung	17
2.3	Analyse der Hämoglobin-Stammlösung während und nach der Aufbereitung	19
2.4	Herstellung der Hämoglobin-Salzlösungen	21
2.4.1	Einwaage der Salze	21
2.4.2	Gelchromatographie und Messung der pH-Werte	23
2.5	Meßanordnung und Meßvorgang	25
2.5.1	Meßanordnung	25
2.5.2	Meßzelle	27
2.5.3	Ionenaustauschermembranen	29
2.5.4	Titrationen	30
2.5.5	KCl-Salzbrücken und Elektroden	30
2.5.6	Elektrische Meßgeräte	31
2.5.7	Meßvorgang	32

3.	Ergebnisse und Diskussion	41
3.1	Stöchiometrische mittlere Aktivitätskoeffizienten	41
3.2	Berücksichtigung der Protein-Wasser-Wechselwirkungen	58
3.3	γ^* als "elektrostatistischer" Aktivitätskoeffizient	63
3.4	γ^* als "chemischer" Aktivitätskoeffizient	66
3.5	Kationenspezifischer Effekt	71
4.	Fehlerbetrachtung	75
5.	Zusammenfassung	77
6.	Literaturverzeichnis	80

1. Einleitung und Problemstellung

Das "Leben" einer Zelle, der kleinsten Einheit im biologischen Organismus, manifestiert sich in den intrazellulären Stoffwechselvorgängen und dem Austausch von Stoffen mit der Umgebung. Die Kenntnis von der chemischen Zusammensetzung des Zytoplasmas und den Wechselwirkungen der verschiedenen Komponenten untereinander ist entscheidend für das Verständnis dieser biologischen Phänomene.

Das Zytoplasma einer durchschnittlichen Säugetierzelle besteht aus folgenden Bestandteilen:

Wasser (85 Gew.%), Proteine (10 Gew.%), Nukleinsäuren (1,1 Gew.%), Lipide (2 Gew.%) und anorganische Substanzen (1,5 Gew.%). Letztere stellen trotz ihres geringen Gewichtsanteils nach dem Zellwasser die größte Anzahl an Molekülen und bestimmen somit zu einem erheblichen Teil das intrazelluläre Milieu.

Es sind in erster Linie Salze, dissoziiert in kleine Ionen wie K^+ , Na^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Cl^- , HCO_3^- und $H_2PO_4^-$, deren Gesamtkonzentration bei allen bekannten Zellarten mit 0,1 - 0,2 Mol pro kg Zellwasser angegeben wird.

Die Proteine beziehen auf Grund der zahlreichen Ladungsgruppen, ihrer verschiedenartigen Stoffwechselfunktionen und der großen Menge eine Sonderstellung. Die Lipide sind vorwiegend in den Membranstrukturen lokalisiert und üben daher einen unbedeutenden Einfluß auf den physikalisch-chemischen Zustand des Zytoplasmas aus.

Somit bestimmen in erster Linie das Zellwasser, die Protein-Polyionen und die kleinen Ionen das intrazelluläre Milieu.

Zwei Modelle bieten sich zu seiner Beschreibung an: Das eine setzt starke Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten, wie hohes Wasserbindungsvermögen der Makromoleküle voraus, wodurch das Zytoplasma zu einem quasi festkörperähnlichen Gefüge wird. TROSCHIN [61] und LING [26-29] entwerfen in ihrer Sorptionstheorie, bzw. Assoziations-Induktions-Hypothese dieses Modell und versuchen auch das für eine Zelle charakteristische Ruhemembranpotential auf die "geordneten polarisierten Schichten" des Zellwassers zwischen der makromolekularen Matrix mit Festionen und die darin "fixierten" kleinen Ionen zurückzuführen.

Im anderen Modell nimmt man eine wässrige Protein-Salz-Lösung an, in der trotz verschiedenartiger Wechselwirkungen die meisten Salzionen frei beweglich vorliegen; in diesem Fall hält ein aktiver Ionentransportmechanismus das Ruhemembranpotential aufrecht, bei dem intrazellulär die K^+ -, extrazellulär die Na^+ -Ionenkonzentration überwiegt.

Die Ergebnisse aus verschiedenen Messungen, wie die der intrazellulären Leitfähigkeit mit hochfrequenten Wechselströmen [37-41], die der Diffusionsgeschwindigkeit kleiner Ionen und Moleküle in der Zelle [9,25] und die der kalorischen Eigenschaften des Zellwassers [5,33,21], lassen diese zweite Modellvorstellung wahrscheinlicher erscheinen.

Messungen der mittleren Aktivitätskoeffizienten von verschiedenen (1,1)Salzen in konzentrierten Proteinlösungen ergaben eine relativ geringe Abnahme des chemischen Potentials der Salzionen gegenüber dem in reinen Salzlösungen und lieferten damit keine Anhaltspunkte für die Existenz festkörperähnlicher Zytoplasmastrukturen [44,46,30,49,48,60,55,50].

Bei der Auswertung der zuletzt angeführten Messungen wurde vorausgesetzt, daß in den Modelllösungen qualitativ die gleichen Wechselwirkungen zwischen Wasser, Proteinpolyionen und Salzionen vorherrschen wie im Zytoplasma. Die elektrostatischen Wechselwirkungen aller Komponenten untereinander, die Bindung von Wasser an der Oberfläche der Proteinmoleküle und die spezifische Ionenbindung an den Proteinpolyionen dürften hierbei dominieren.

In den Arbeiten von PFISTER [44] und RÄMISCH [48] wurden neben Wasser Rinderserumalbumin (RSA) und KCl als Modellkomponenten verwendet. Die genauere Kenntnis der spezifischen Anionenbindung am RSA-Molekül ermöglichte es, den Anteil am mittleren Aktivitätskoeffizienten, der auf diese Bindung zurückzuführen ist, abzutrennen. Somit konnten die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den geladenen Komponenten quantitativ erfaßt werden.

In den Arbeiten von MENGES [30] und RAU [49], die entsprechende Messungen an Hämoglobin-Salzlösungen durchführten, war dies nicht möglich. Erst TRETTNER [60] konnte die Interpretationen der oben genannten Meßergebnisse bestätigen und die Annahme einer

spezifischen Anionenbindung an das Hämoglobinmolekül sehr wahrscheinlich machen. Außerdem konnte er den gesamten Einfluß der Hämoglobinmoleküle auf das chemische Potential von NaCl - bei gleichbleibender Hämoglobin- und variierender NaCl-Konzentration - in zwei Faktoren aufgliedern und deren Anteil quantitativ abschätzen.

In zwei parallelaufenden Arbeiten sollte nun untersucht werden, welchen Einfluß die Hämoglobinmoleküle auf das chemische Potential anderer (1,1)Salze ausüben.

Dabei war zu erwarten, daß ionenspezifische Effekte, etwa eine spezifische Anionen- oder Kationenbindung, sich durch eine unterschiedliche Veränderung der Ionenaktivitäten von Salzen mit Ionen verschiedener Radien bemerkbar machen.

Für solche Untersuchungen bieten sich die lyotropen Kationen- oder Anionenreihen an, also Hämoglobin-Alkalichlorid-, bzw. Hämoglobin-Kaliumhalogenid-Lösungen.

Während SCHMID [55] die Kaliumhalogenid-Lösungen untersuchte, befaßt sich die vorliegende Arbeit mit der Messung in Hämoglobin-Alkalichlorid-Lösungen.

Die Hämoglobinkonzentration bewegte sich zwischen 5 Gew.% und 44,76 Gew.%, während die Konzentration der vier Alkalichloride LiCl, KCl, RbCl und CsCl in den Hämoglobinlösungen konstant bei 0,1 Mol/kg H₂O gehalten wurde.

Wie in den oben genannten Arbeiten waren auch hier die mittleren Aktivitätskoeffizienten der Salze das

Maß für die Wechselwirkungen der Salzionen untereinander und mit den Proteinpolyionen. Zur Messung dienten, einem Vorschlag von SCATCHARD [54] folgend, Ionenaustauscher-"Membran-Elektroden" [10,56].

2. Methodik

2.1 Theorie der Messung

2.1.1 Die EMK einer elektrochemischen Meßzelle mit Membranelektroden

Zwischen den Elektroden einer elektrochemischen Meßzelle läßt sich stromlos eine Potentialdifferenz E abgreifen, die als elektromotorische Kraft (EMK) dieser Zelle bezeichnet wird. Die Messung ist durch eine von außen angelegte Kompensationsspannung gleicher Größe möglich. Die Thermodynamik definiert die EMK als die elektrische Arbeit, die beim Verschieben von einem Mol elektrischer Elementarladung ($= 1$ Faraday) über die Potentialdifferenz E geleistet wird. Die Abnahme der freien Enthalpie ΔG der elektrochemischen Zelle bei diesem reversibel und isotherm ablaufenden Prozeß - unter konstantem Druck in allen Phasen - ist gleich der elektrischen Arbeit $F \cdot E$ im äußeren Stromkreis [20]:

$$- \Delta G = F \cdot E, \quad (6/1)^{+)}$$

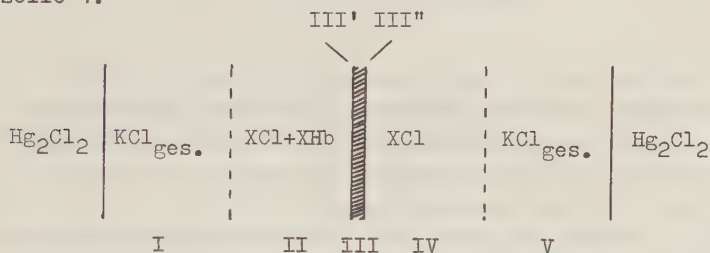
wobei ΔG die Änderung der freien Enthalpie der elektrochemischen Meßzelle,
 F die Faraday-Konstante,
 E die Potentialdifferenz zwischen den beiden Elektroden, gemessen im stromlosen Zustand ($\equiv$ EMK) ist.

^{+) (6/1)} bedeutet: "Seite 6, Gleichung 1"

Im Folgenden werden alle Formeln nach diesem Schema bezeichnet.

Bei der im Folgenden behandelten elektrochemischen Zelle werden die Alkalichloride LiCl, KCl, RbCl, CsCl mit X-Cl, die Hämoglobinlösungen verschiedener Konzentration mit X-Hb bezeichnet.

Zelle 1:



In diesem Schema einer elektrochemischen Zelle bedeuten die Phasen I und V Salzbrücken (=gesättigte KCl-Lösungen), in die je eine Kalomelelektrode eintaucht, Phase II stellt eine Hämoglobin-Alkalichlorid-Lösung, Phase IV eine reine Alkalichlorid-Lösung dar.

III kennzeichnet die wässrige, nur für die verwendeten Salze und Wasser durchlässige Membranphase, wobei III' und III'' die Übergänge zu Phase II bzw. IV darstellen.

Für die EMK dieser elektrochemischen Zelle gilt folgende Beziehung [44]:

$$- F \cdot E = \int_I^V \sum_i T_i \cdot d\mu_i \quad , \quad (7/1)$$

wobei T_i die Transportzahl der Neutralkomponente i , die der Zahl der beim Ladungstransport von 1 F in Stromrichtung verschobenen Mole der Sorte i entspricht, und μ_i das chemische Potential der Neutralkomponente i ist.

Die EMK ist also eine Funktion der Transportzahlen und der chemischen Potentiale der Neutralkomponenten in den einzelnen Phasen. Beträge liefert das Integral nur dort, wo mindestens für eine Neutralkomponente $d\mu \neq 0$ und gleichzeitig $T_i \neq 0$ ist.

Die Änderung des chemischen Potentials der durchtrittsfähigen Neutralkomponenten an den beiden Grenzflächen Membran-Lösung wird Null - bei Annahme scharfer Phasengrenzen - wegen der Einstellung eines elektrochemischen Gleichgewichts an denselben [44].

Der Hämoglobinanteil leistet keinen Beitrag zur EMK, da in der Membran $T_{Hb} = 0$, d.h. die Membranphase undurchlässig für Hämoglobin ist.

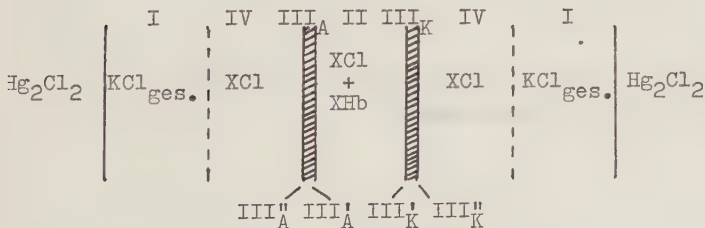
Ersetzt man nun in Gleichung (7/1) die Transportzahlen T_i der Neutralkomponenten durch die elektrochemischen Überföhrungszahlen t_i ihrer Ionenbestandteile, so erhält man:

$$\begin{aligned}
 - F \cdot E' &= + \int_I^{II} \left[t_{K+d} \mu_{KCl} + (t_{X^+} + t_{Hb}) d\mu_{XCl} \right. \\
 &\quad \left. - \frac{t_{Hb}}{|Z_{Hb}|} d\mu_{XHb} \right] \\
 &+ \int_{III'}^{III''} (t_{X^+} d\mu_{XCl} + t_{H_2O} d\mu_{H_2O}) \\
 &+ \int_{IV}^V (t_{K+d} \mu_{KCl} + t_{X^+} d\mu_{XCl}) , \quad (9/1)
 \end{aligned}$$

mit Z_{Hb} = Bilanzladungszahl der Hämoglobinmoleküle.

Schaltet man zwei Zellen dieses Typs gegeneinander, so erhält man folgende Doppelzelle.

Zelle 2:



Die Phasen werden entsprechend Zelle 1 benannt.

III_A bedeutet Anionen-, III_K Kationenaustauscher-
membran.

Die Differenz aus zwei EMK-Werten des einfachen Zell-
typs ergibt die EMK der Doppelzelle:

$$\begin{aligned}
 - F \cdot E_D &= \int_{III_K}^{III_K''} (t_{X^+} d\mu_{XCl} + T_{H_2O} d\mu_{H_2O}) \\
 &- \int_{III_A}^{III_A''} (t_{X^+} d\mu_{XCl} + T_{H_2O} d\mu_{H_2O}) \quad . \quad (10/1)
 \end{aligned}$$

Verwendet man eine Anionen- und eine Kationenaustau-
schermembran - III_A bzw. III_K - so nimmt E_D auf Grund
der unterschiedlichen Membraneigenschaften von Null
verschiedene Werte an.

Es gilt: in der Anionenaustauschermembran:

$$t_{Cl^-} \gg t_{X^+}$$

in der Kationenaustauschermembran:

$$t_{X^+} \gg t_{Cl^-}$$

Daher läßt sich nach Gleichung (10/1) die mittlere
Aktivität von Salzen bestimmen.

Wenn nun μ_S das chemische Potential eines Salzes S,
 $\mu_{S,0}$ das chemische Standardpotential eines Salzes S,
 a_S die Aktivität von S,
 R die universelle Gaskonstante und
 T die absolute Temperatur ist,
dann gilt per definitionem [22]:

$$\mu_S = \mu_{S,0} + R \cdot T \cdot \ln a_S . \quad (11/1)$$

Außerdem gilt für (1,1)Salze [22]:

$$a_S = (a_{\pm})^2 , \quad (11/2)$$

wobei $a_{\pm}$ die mittlere Ionenaktivität von S ist
und

$$\mu_{S,0}^{IV} = \mu_{S,0}^{II} . \quad (11/3)$$

Mit den Gleichgewichtsbedingungen für die Neutralekomponenten an den Membrangrenzflächen

$$\begin{aligned} \mu_S^{III'K} &= \mu_S^{II} = \mu_S^{III'A} \\ \mu_S^{III''K} &= \mu_S^{IV} = \mu_S^{III'A} \end{aligned} \quad (11/4)$$

$$\begin{aligned}\mu_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{III!K}} &= \mu_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{II}} = \mu_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{III!A}} \\ \mu_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{III!K}} &= \mu_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{IV}} = \mu_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{III!A}}\end{aligned}\quad (12/1)$$

ergibt sich für die EMK der Doppelzelle aus Gleichung (10/1):

$$\begin{aligned}-F \cdot E_D &= 2 \cdot R \cdot \gamma \cdot (1 - \tau_-^{\text{K}} - \tau_+^{\text{A}}) \cdot \ln \frac{a_{\pm}^{\text{IV}}}{a_{\pm}^{\text{II}}} \\ &+ \frac{1}{2} \left(\tau_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{K}} - \tau_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{A}} \right) \cdot \ln \frac{a_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{IV}}}{a_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{II}}},\end{aligned}\quad (12/2)$$

wobei τ_+^{K} und τ_-^{K} die Integralmittelwerte der Überföhrungszahlen der Kationen bzw. Anionen in der Kationenaustauschermembran, τ_+^{A} und τ_-^{A} die Integralmittelwerte der Überföhrungszahlen der Kationen bzw. Anionen in der Anionenaustauschermembran, $\tau_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{K}}$ und $\tau_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{A}}$ die Integralmittelwerte der Transportzahlen für H_2O in den beiden Membranen, $a_{\pm}^{\text{II}}$ und $a_{\pm}^{\text{IV}}$ die mittlere Aktivität der Salze in den Phasen II und IV, $a_{\text{H}_2\text{O}}$ die mittlere Aktivität von Wasser, R die universelle Gaskonstante und γ die absolute Temperatur bedeuten.

Diese Gleichung bildet mit ihrer Beziehung zwischen der meßbaren EMK und der mittleren Aktivität des Salzes in Phase II und IV die theoretische Grundlage zur Messung der mittleren Aktivitätskoeffizienten.

Der Anteil der Wasserüberführung an der EMK (zweiter rechter Summand in Gleichung (12/2)) ist für die im vorliegenden Fall verwendeten Membranen und Lösungen vernachlässigbar klein [44].

Gleichung (12/2) geht somit über in

$$- F \cdot E_D = 2 \cdot R \cdot \gamma (1 - \bar{t}_-^K - \bar{t}_+^A) \ln \frac{a_{\pm}^{IV}}{a_{\pm}^{II}} . \quad (13/1)$$

Für "ideale" Membranen gehen die Coionenüberführungszahlen gegen Null und Gleichung (13/1) vereinfacht sich zu

$$E = - \frac{2 \cdot R \cdot \gamma}{F} \cdot \ln \frac{a_{\pm}^{IV}}{a_{\pm}^{II}} . \quad (13/2)$$

E entspricht in diesem Fall der EMK einer Helmholtz'schen Doppelzelle mit Elektroden, die selektiv und reversibel die Kationen des jeweiligen Salzes, wie Li^+ , K^+ , Rb^+ und Cs^+ , bzw. Cl^- -Ionen abgeben und aufnehmen [24].

Diese elektrodenartigen Eigenschaften der Membrangrenzflächen führten zu der Bezeichnung "Membranelektroden" [53].

2.1.2 Bestimmung der mittleren Aktivität

Die Nulltitrationmethode von SOLLNER [56] ermöglicht die Bestimmung der mittleren Aktivität von Alkalichloriden in Phase II mit hoher Genauigkeit. Zugrunde liegt der Gedanke, daß nach Gleichung (13/1) für $E = 0$ gilt:

$$a_{\pm}^{\text{II}} = (a_{\pm}^{\text{IV}})_{E=0} \quad (14/1)$$

Außerdem gilt:

$$a_{\pm} = \gamma_{\pm} \cdot m_s, \quad (14/2)$$

wobei $a_{\pm}$ die mittlere Aktivität eines Alkalichlorids,
 $\gamma_{\pm}$ der mittlere Aktivitätskoeffizient des Alkalichlorids und
 m_s die Konzentration des Salzes in Mol/kg H_2O ist.

Man kann also mit Hilfe verschiedener Salzkonzentrationen in Phase IV $a_{\pm}^{\text{IV}}$ in dem Bereich verändern, der den zu erwartenden $a_{\pm}^{\text{II}}$ Wert von $a_{\pm}^{\text{II}}$ - bei konstanter Salzkonzentration in Phase II - einschließt. Die Meßgröße $(a_{\pm}^{\text{IV}})_{E=0}$ läßt sich graphisch oder rechnerisch mittels linearer Regression aus den variierten Werten von $a_{\pm}^{\text{IV}}$ und den entsprechenden positiven und negativen E - Werten ermitteln. (Zur praktischen Durchführung der Messungen siehe Seite 25 - 34)

2.2 Herstellung der Hämoglobinlösung

2.2.1 Hämoglobin-Stammlösung

Die Hämoglobinlösung wurde nach der teilweise übernommenen Methode von DRABKIN, HINSON und BERGER [17, 23,6] aus Rinderblut gewonnen.

Bei Entnahme wurde das Blut mit 3,2 %iger Na-Citratlösung versetzt (1,5 l Na-Citratlösung, p.A.; Merck, auf 5,5 l Blut); 30 Minuten bis spätestens 1 Stunde danach begann die Aufbereitung.

Der erste Zentrifugengang (Christ, Kühlzentrifuge; Typ: Junior II KS; 40 Min. mit 2600 rpm, entsprechend 1950 g, bei 4°C) diente zur Abtrennung des Plasmas und anderer Bestandteile von den Erythrozyten.

Der klare Plasmaüberstand und die sahnige Leukozytenschicht wurden abgesaugt.

In den folgenden 4 Zentrifugengängen (Christ, Kühlzentrifuge; Typ: Junior II KS; 20 Min. 5600 rpm, entsprechend 5470 g, bei 4°C) wurde die dickflüssige Erythrozytensuspension gewaschen.

Dabei wurde sie einmal mit 0,9 %iger und dreimal mit 1,2 %iger NaCl-Lösung (NaCl, p.A.; Merck, + aqua demineralisata) im Verhältnis Suspension zu Waschlösung von jeweils 1 : 5 gemischt. ⁺⁾

⁺⁾ Auf die von DRABKIN [16] erwähnte Zugabe von 0,0025 Molen $AlCl_3$ zur Waschlösung wurde verzichtet, weil sie laut MENGES [30] zur Koagulation der Erythrozyten führte.

Nach jedem Lauf wurde der klare Überstand abgesaugt und die Erythrozytensuspension wieder mit Waschlösung im gleichen Verhältnis aufgefüllt. Darauf wurden die Erythrozyten in der Ultrazentrifuge (Beckman, Spinco L 2, Rotor 19; mit 19000 rpm, entsprechend 17000 g bis 55000 g, bei 4°C) nochmals 90 Minuten lang von den leichteren Bestandteilen getrennt.

Nach Absaugen des wässrigen Überstandes wurde der zähflüssige Erythrozytenrückstand zur Hämolyse mit aqua demineralisata und Toluol im Volumenverhältnis 1 : 1,2 : 0,4 gemischt und mindestens 6 bis 8 Stunden bei 4°C kräftig gerührt.

Das Toluol sollte die Membranlyse beschleunigen und gleichzeitig den Bakterienwuchs in der Hämoglobininlösung stoppen und diese dadurch für Messungen brauchbar erhalten. Am Hämoglobinemolekül ließ sich keine Denaturierung durch Toluol nachweisen; nach HINSON und McMEEKIN [23] begünstigt Toluol sogar die Hämoglobinkristallbildung.

Durch jeweils einen Gang in der Kühlzentrifuge (Christ, Typ: Junior II KS; 90 Min. mit 2600 rpm, entsprechend 1950 g, bei 4°C) und der Ultrazentrifuge (Beckman, Spinco L 2; Rotor 19; 90 Min. mit 19000 rpm, entsprechend 17000 g bis 53000 g, bei 4°C) konnten Toluol und Erythrozytenstroma abgetrennt und anschließend abgesaugt werden.

Die so erhaltene tiefrote Hämoglobininlösung mit einer Konzentration von 8 bis 12 Gew.% zeigte sich nach MENGES [30] im Dunkelfeldmikroskop durchgehend klar und homogen.

2.2.2 Entsalzen der Hämoglobin-Stammlösung

Die Hämoglobin-Stammlösung wurde beim Durchlaufen zweier Mischbett-Ionenaustauschersäulen (Bio-Rad, AG 501-X8 D, bei 4°C) entionisiert. Nach TRETTER [60] bewirkt der Ionenaustauscher keine Veränderungen am Hämoglobinmolekül. Anhand von Leitfähigkeitsmessungen wurde der Grad der Entsalzung vor und nach der Behandlung kontrolliert.

2.2.3 Aufkonzentration der Hämoglobin-Stammlösung

Mit Hilfe folgender Geräte, geliefert von der Firma Sartorius Membranfilter GmbH in Göttingen, wurde die Hämoglobin-Stammlösung ultrafiltriert und so die Ausgangskonzentration von 8 bis 12 Gew.% auf über 40 Gew.% angehoben (s. Abb. 1, S.18):

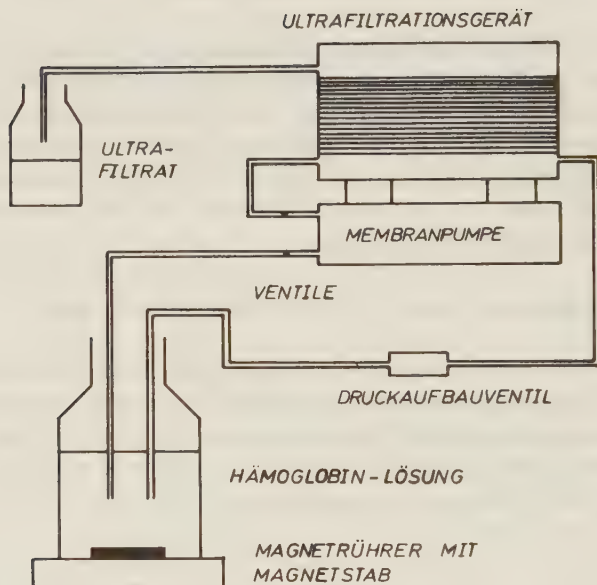


Abb. 1: Schematische Darstellung der Ultrafiltrationsapparatur

Die Hämoglobinlösung wurde von der Membranpumpe (Typ: SM 168-9, Förderleistung: 500 ml $\text{H}_2\text{O}/\text{min}$) aus ihrem Behälter angesaugt und mit einem Druck von $2 \cdot 10^5$ Pa in das Ultrafiltrationsgerät gepresst (Typ: SM 16525). Dort wurde die Lösung an jeweils einer Seite von sieben, einzeln zwischen Polycarbonatplatten (Makrolon, Bayer) liegenden Ultrafiltrationsmembranen vorbeigeleitet.

Die Membranen vom Typ: SM 121-36 bestanden aus Cellulosenitrat mit einer Durchlässigkeit für Substanzen bis zu einem Molekulargewicht von 10000, der Porendurchmesser betrug 5 nm und die Durchlässigkeit für Wasser war $0,5 - 0,3 \cdot 10^{-2} \text{ ml/min cm}^2$, bei einer Druckdifferenz von $9,31 \cdot 10^4$ Pa. Den erforderlichen Druck im Filtergerät hielt das nachgeschaltete Druckaufbauventil aufrecht, durch das die Hämoglobinlösung wieder in den Behälter zurückfloß. Das abgepresste Ultrafiltrat wurde in ein zweites Gefäß geleitet. Am Ultrafiltrat vorgenommene Analysen mit Nessler's Reagenz blieben negativ, es tauchte also kein durch eventuelle bakterielle Protein-zersetzung entstandener Ammoniak auf. Die anfängliche Filtrationsgeschwindigkeit von 250 ml/h sank mit zunehmender Hämoglobinkonzentration auf 70 ml/h. Während der ca. 14 Stunden dauernden Aufkonzentration wurde die Lösung dauernd mit Magnetrührer bei mittlerer Geschwindigkeit durchmischt; die Temperatur betrug ca. 4°C .

2.3 Analyse der Hämoglobin-Stammlösung während und nach der Aufbereitung

Es mußte zunächst der Trockengewichtsanteil von Hämoglobin in der Lösung ermittelt werden: 2 - 3 ml Hämoglobinlösung wurden bei 110°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und danach mit einer Mikrowaage (Mettler, Analysenwaage B 6) gewogen, wobei die Genauigkeit der Bestimmung bei $\pm 0,1 \%$ lag.

Wesentlich schneller konnte die Konzentration durch eine Dichtemessung bestimmt werden [7]. ⁺⁾

Nach folgender Gleichung wurde dann die Molalität des Hämoglobins berechnet:

$$m_{\text{Hb}} = \frac{\xi \cdot 1000}{(1 - \xi) \cdot G_{\text{Hb}}} , \quad (20/1)$$

wobei m_{Hb} die Anzahl der Mole Hämoglobin/ kg H_2O ,
 ξ der Hämoglobin-Trockengewichtsanteil,
 G_{Hb} das Molekulargewicht von Hämoglobin
 ($\text{MG} = 64500$) [3] ist.

Bei den Messungen wurden Lösungen mit verschiedenen Hämoglobinkonzentrationen verwendet, die zwischen $0,816 \cdot 10^{-3}$ und $12,578 \cdot 10^{-3}$ Mol/ kg H_2O , entsprechend 5 - 44,76 Gew.%, lagen. Die Einstellung der verschiedenen Konzentrationen wird im Abschnitt 4 dieses Kapitels beschrieben.

TRETTNER [60] hat an Hand ausführlicher Extinktionsmessungen und Gelfiltrationen sofort nach Aufbereitung und Aufkonzentration nachgewiesen, daß am Hämoglobinmolekül keine meßbaren Veränderungen eingetreten waren; dasselbe bestätigten Messungen des pH-Wertes. Nach Messungen von MÜLLER [34] betrug der Methämoglobinanteil der Hämoglobin-Stammlösung 5 bis 8 Tage nach Aufbereitung ca. 10 %.

⁺⁾ Für die Durchführung der Dichtemessungen möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Dr.J.Bernhardt bedanken.

Bei ebenfalls von TRETTER [60] durchgeführten Bestimmungen des Restionengehaltes nach Entionisation lagen die NaCl- und KCl-Konzentrationen bei $\leq 8 \cdot 10^{-5}$ bzw. $< 8 \cdot 10^{-7}$ Mol/l, so daß bei Zugabe von 10^{-1} Mol NaCl bzw. KCl pro Kilogramm Wasser der Konzentrationsfehler kleiner als 0,1 % bzw. 0,001 % ist. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Kontrollmessungen der spezifischen Leitfähigkeit lagen in dem von TRETTER [60] angegebenen Bereich von $10 - 15 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.4 Herstellung der Hämoglobin-Salz-Lösungen

2.4.1 Einwaage der Salze

Folgende Alkalichloride wurden verwendet: LiCl, KCl, RbCl und CsCl. Die aufkonzentrierte Hämoglobin-Stammlösung, meist 500 - 600 g, wurde in vier Teile aufgeteilt, so daß pro Salz ca. 110 - 150 g zur Verfügung standen. Diese Menge reichte aus, um für jedes der oben genannten Alkalichloride 5 Meßlösungen à 30 - 50 g verschiedener Hämoglobinkonzentrationen herzustellen.

Die vier konzentrierten Hämoglobinlösungen wurden auf die Konzentration von 0,1 Mol jeweils eines der verwendeten Salze pro kg H_2O durch Einwaage (Genauigkeit $\pm 10^{-4}$ g) der entsprechenden Salzmenge eingestellt.

Von den einzelnen Hämoglobin-Alkalichlorid-Lösungen wurden nun immer die Mengen abgezweigt, die - mit einer 0,1 molalen Lösung des entsprechenden Salzes

auf 30 - 50 g aufgefüllt - die neben der Höchstkonzentration gewünschten Hämoglobinkonzentrationen ergaben.

Mit dieser Methode konnte das zeitraubende und ungenaue mehrmalige Abwägen kleinster Salzmengen vermieden werden.

LiCl bildete mit seiner starken hygroskopischen Eigenschaft eine Ausnahme und bereitete deshalb bei der Herstellung der LiCl- und Hämoglobin-LiCl-Lösungen einige Schwierigkeiten.

Das Gewicht des getrockneten Salzes unter Luftzutritt nahm innerhalb von Sekunden rasch zu. Da es kompliziert war, vorausberechnete kleine Salzmengen unter Luftabschluß abzuwägen, bediente man sich folgender Methode:

Die ungefähr benötigte Menge LiCl wurde im Trockenschrank 48 Stunden lang bei ca. 110°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann unter Luftabschluß genau gewogen (relativer Fehler $< \pm 0,01\%$). Zu dieser Salzmenge ließ sich nun leicht die für eine 1 molale LiCl-Lösung erforderliche Wassermenge berechnen und abwiegen.

Mit Hilfe dieser 1 molalen LiCl-Lösung konnten nun durch Verdünnen die verschiedenen Titrationslösungen - mit Konzentrationen von 0,07 - 0,15 Mol LiCl/ kg H_2O - hergestellt werden.

Ebenso war die Einstellung der Hämoglobin-LiCl-Lösung auf 0,1 Mol/ kg H_2O Salzkonzentration durch Zugabe der 1 molalen LiCl-Lösung mittels folgender Gleichung möglich:

$$G_{\text{LiCl}}^{(1\text{m})} = \frac{W_{\text{Hb}}}{9} (1 + M_{\text{LiCl}} 10^{-3}) ; \quad (23/1)$$

wobei $G_{\text{LiCl}}^{(1\text{m})}$ das Gewicht der einzuwiegenden
1 molalen Salzlösung (hier LiCl)
in Gramm,
 W_{Hb} die in der Hämoglobinlösung ent-
haltene Wassermenge in Gramm,
 M_{LiCl} das Mol-Gewicht von LiCl (42,39 g)
ist.

Die durch die Zugabe der Lösung etwas erniedrigte
Hämoglobinkonzentration wurde nachträglich neu be-
rechnet. Die Genauigkeit der Salzkonzentration der
Hämoglobin-Alkalichlorid-Lösungen betrug $\pm 0,1$ %.
Die so gewonnenen Hämoglobin-Alkalichlorid-Lösungen
wurden bis zur Messung in Polyäthylenfläschchen bei
4°C aufbewahrt.

2.4.2 Gelchromatographie und Messung der pH-Werte

Um zu erfahren, ob durch die Salze LiCl, KCl, RbCl
und CsCl die Struktur der Hämoglobinmoleküle verän-
dert wurde, führte PEUTEN [43] Gelfiltrationen durch.
Dabei verwendete er eine zwei Meter lange mit Sepha-
dex Gel 150 gefüllte Glassäule bei einer Betriebs-
temperatur von 2°C. Sie wurde jeweils mit sterili-
sierter und entgaster 0,1 molaler Salzlösung äqui-
libriert.

Aufgetragen wurden dann jeweils 3 ml einer 1 - 1,5 %igen Hämoglobin-Salz-Lösung. Bei jedem der oben genannten Salze erschien an der selben Stelle eine einzige Fraktion als steiler, annähernd symmetrischer Peak im Chromatogramm. Eine destruktive Veränderung des Hämoglobinmoleküls durch die verwendeten Salze darf demnach ausgeschlossen werden. Ebenfalls von PEUTEN [43] wurden Messungen der pH-Werte der Hämoglobin-Alkalichlorid-Lösungen mittels eines Radiometer-pH-Meters (Typ: 25 Se der Fa. Radiometer, Kopenhagen) mit einer Einstabglaselektrodenkette durchgeführt. ⁺⁾

Unabhängig von der Hämoglobinkonzentration wurden bei Zimmertemperatur (23°C) folgende pH-Werte gemessen:

LiCl-Hb-Lösung:	pH 7,20
KCl-Hb-Lösung:	pH 7,21
RbCl-Hb-Lösung:	pH 7,21
CsCl-Hb-Lösung:	pH 7,22

⁺⁾ Für die Durchführung der Gelfiltration und der pH-Wert-Messung möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Dr.M.Peuten bedanken.

2.5 Meßanordnung und Meßvorgang

2.5.1 Meßanordnung

Die Messung der mittleren Aktivität von Alkalichloriden in konzentrierten Hämoglobinlösungen wurde nach der Methode von PFISTER [44] mit Ionenaustauscher-Membranelektroden vorgenommen.

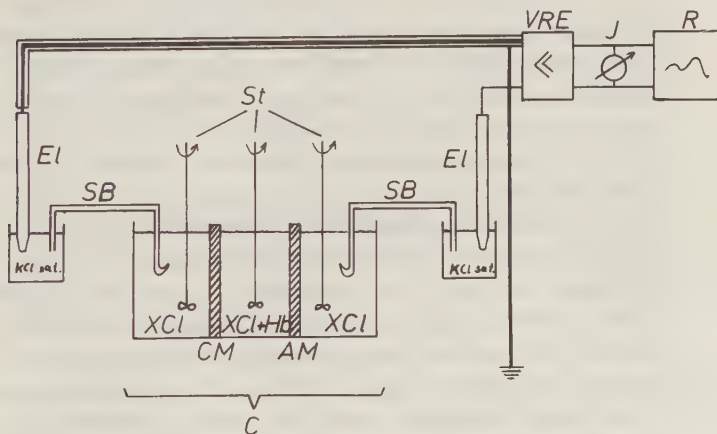


Abb. 2: Schematischer Aufbau der Meßanordnung zur Bestimmung der mittleren Aktivität der Alkalichloride in konzentrierten Hämoglobinlösungen mit Ionenaustauscher-Membranelektroden:

C	Dreikammer-Meßzelle
CM	Kationenaustauschermembran
AM	Anionenaustauschermembran
St	Rührvorrichtung
SB	Salzbrücken (KCl gesättigt in Agar-Agar)
V	Vorratsgefäß (KCl gesättigt)
VRE	Meßverstärker
I	Anzeigeeinstrument
R	Potentiometerschreiber
El	Thalamid-Elektroden

Die Meßzelle setzte sich aus drei Kammern zusammen, wobei je eine Kationen- bzw. Anionenaustauschermembran als Trennwände fungierten. Die beiden äußeren Kammern ~~enthielten~~ die jeweils verwendeten Alkalichlorid-Titrationslösungen, während die mittlere Kammer mit den entsprechenden Hämoglobin-Alkalichlorid-Lösungen (Meßlösungen) gefüllt war.

Die in die äußeren Kammern eintauchenden Salzbrücken (SB) standen mit zwei Thalamidelektroden (El) in Verbindung, an denen die Spannungen abgegriffen und von elektrischen Geräten verstärkt, angezeigt und aufgezeichnet wurden (Meßverstärker VRE, Anzeigeeinstrument I, Potentiometerschreiber R). Ein Rührwerk mit regelbarer Drehzahl sorgte für ständige Rührung der Lösungen. Die ganze Apparatur, Hauptverstärker und Schreiber ausgenommen, war durch einen Faraday'schen Käfig gegen elektrische Störfelder abgeschirmt.

2.5.2 Meßzelle

Folgende Abbildung zeigt die Meßzelle im Längsschnitt.

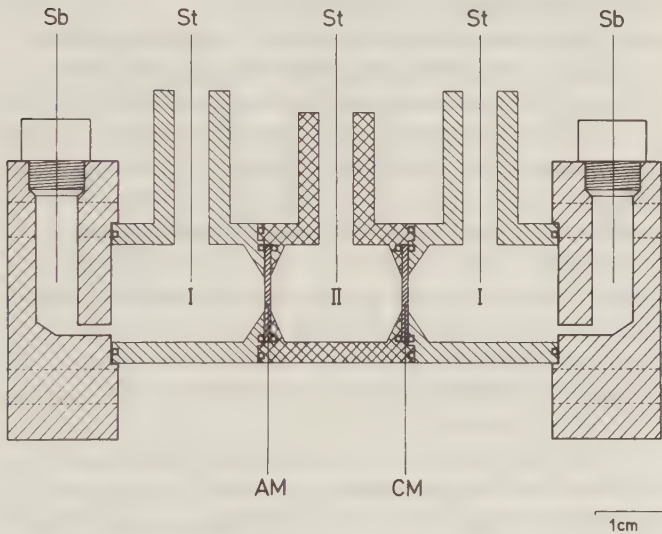


Abb. 3: Längsschnitt durch die Dreikammermeßzelle (nach [50]).

- I Kammern für die Alkalichlorid-Titrationslösungen identischer Konzentration
- II Kammer für die Alkalichlorid-Hämoglobininlösung
- AM, CM Anionen- bzw. Kationenaustauschermembran

St Einfüllstutzen, Rührer
Sb Elektrodenräume zur Aufnahme der
Salzbrückenenden
(Material: Plexiglas, Silicongummi-Dich-
tungsringe).

Die in Abb. 3 dargestellte Meßzelle wurde aus vorher
entspanntem Plexiglas gefertigt. ^{†)}

Die Trennwände zwischen den drei Kammern bildeten
die zwei Ionenaustauschermembranen (M) mit einer
Kontaktfläche zu den angrenzenden Lösungen von
 $0,12 \text{ cm}^2$; als Dichtungen dienten Silicongummi-Ringe.
Zusammengehalten wurde die Meßzelle von langen
Schrauben, die in den Flanschen rechts und links
verankert waren. Durch den starken Andruck der
Dichtungen an die Membranen war die vollständige
Abdichtung der Kammern untereinander gewährleistet.
Die Kammern mit einem Volumen von 3 - 5 ml waren
mit Einfüllstutzen (St) versehen, die neben dem Lö-
sungsmittelaustausch auch zum Einführen der Plastik-
Rührstäbe dienten.

Die empfindlichen, aus Glasröhrchen gezogenen Salz-
brücken-Kapillaren standen geschützt in eigenen
Elektrodenräumen (Sb), die Verbindung zu den Kammern
stellten 2 mm starke Bohrungen dar.

^{†)} Die Zelle wurde von Herrn Lehmeier hergestellt;
für seine hilfsbereite Unterstützung in allen tech-
nischen Fragen möchte ich ihm an dieser Stelle danken.

2.5.3 Ionenaustauschermembranen

Die Membranen, hergestellt von der Fa. Ionics, Watertown, Mass., USA, bestanden aus Polystyrol, das mit Divinylbenzol vernetzt und dem Stützgewebe "Dynel" mechanisch stabilisiert ist.

Die Kationenaustauschermembran (Typ: Nepton CR-61) ist mit SO_3^- - Festionen besetzt, während die Anionenaustauschermembran (Typ: Nepton AR-111) ternäre und quaternäre Ammoniumbasen als Festionen enthält.

Die Konzentration der SO_3^- - Festionen liegt bei 4,12 Äquival/ kg H_2O , die der Ammoniumbasen bei 2,18 Äquival/ kg H_2O [19,45,44].

Mit ihrem Vernetzungsgrad von ca. 30 % sind die Membranen für größere Moleküle, wie Hämoglobin, nicht durchlässig.

Sind die Membranen im Gleichgewicht mit 0,1 molaler KCl-Lösung, so werden pro Faraday überführte elektrische Ladung ca. 8 Mole H_2O transportiert [58,44,59], während die mittleren Coionenüberführungszahlen in den Membranen unter den selben Bedingungen bei 0,03 bis 0,08 liegen.

Vor Gebrauch wurden vier Membranenpaare (Dicke 0,7 mm, ϕ ca. 10 mm) in konzentrierten Lösungen der vier verwendeten Salze mit deren Ionen beladen und dann in 0,1 molalen Salzlösungen - entsprechend der Konzentration in den Meßlösungen - äquilibriert. Die Lösungen verhinderten auch das Austrocknen der Membranen bei der Lagerung, bei der eine Temperatur von ca. 4°C herrschte.

2.5.4 Titrationslösungen

Von jedem der vier verwendeten Alkalichloride wurden fünf Titrationslösungen mit Konzentrationen von 0,07 bis 0,15 Mol/ kg H₂O hergestellt. Dazu diente demineralisiertes Wasser mit einer spezifischen Leitfähigkeit von etwa $10^{-7} \mu S cm^{-1}$ (bei 23°C) als Lösungsmittel. (Zur Herstellung der LiCl-Lösungen siehe Seite 22 und 23). Der beim Wägen entstandene Konzentrationsfehler lag unter $\pm 0,01 \%$. Als Behälter wurden Polyäthylen-Flaschen gewählt. Die bei 4°C aufbewahrten Lösungen wurden vor Gebrauch auf Zimmertemperatur erwärmt.

2.5.5 KCl-Salzbrücken und Elektroden

Die zwei KCl-Salzbrücken setzten sich aus je drei miteinander verbundenen Elementen zusammen:

1. Einer Borsilikatglas-Kapillare mit einem U-förmig aufgebogenen Ende, das zu einer Spitze von ca. 100 μm Innendurchmesser ausgezogen war. Das Kapillarlumen war mit 1,2 %igem, KCl gesättigtem Agar-Agar-Gel (DIFCO, purified agar) ausgefüllt.
2. Einem mit gesättigter KCl-Lösung gefüllten PVC-Schlauch von 1 mm Innendurchmesser.
3. Einem Vorratsgefäß mit gesättigter KCl-Lösung.

Die Glaskapillaren tauchten in die Titrationslösungen ein und waren über die PVC-Schläuche mit den Vorratsgefäßen verbunden.

Auf diese Weise entstand eine elektrisch leitende Verbindung zwischen den Titrationslösungen und den beiden Thalamid-Bezugselektroden (Fa. Schott&Gen., Mainz), die ebenfalls in die Vorratsgefäße tauchten. Das Agar-Agar-Gel in den Kapillaren senkte die Diffusion und Konvektion von KCl-Lösung in die Titrationslösungen soweit, daß nach PFISTER [44] deren Konzentrationsänderung während der Messung vernachlässigbar klein verglichen mit den übrigen experimentellen Fehlern der Methode blieb.

2.5.6 Elektrische Meßgeräte

Der verwendete Gleichspannungsmeßverstärker der Fa. Frieeseke&Höpfner (Typ: FHT 408 A) ermöglichte mit seinem Eingangswiderstand von 10^{11} Ohm und der Eingangskapazität von 15 pF eine praktisch stromlose Messung der EMK.

Die Messungen erfolgten im 10 mV - Bereich des Anzeigeelements, wobei ein eingebauter Kompensator auch das Ablesen von Spannungen > 10 mV in demselben Bereich zuließ.

Die Einstellgenauigkeit der Kompensationsspannung lag im ungünstigsten Fall bei $\pm 0,1$ mV.

Gleichzeitig registrierte der Kompensationsschreiber (Servogor, Fa. Metrawatt, Nürnberg) die gemessenen EMK-Werte.

Die Ablesegenauigkeit von $\pm 0,05$ mV ergab zusammen mit der Einstellgenauigkeit der Kompensationsspannung eine maximale Meßunsicherheit von $\pm 0,15$ mV.

2.5.7 Meßvorgang

Wie in Abb. 3 dargestellt, wurden in die mittlere Kammer der Dreikompartiment-Meßzelle die Hämoglobin-Alkalichlorid-Lösung, in die beiden Außenkammern die Titrationslösung eingefüllt. Nachdem die Glaskapillaren in die Elektrodenkamine eingeführt und das Rührwerk eingeschaltet waren, wurde der EMK-Wert gemessen und registriert.

Um eine Titrationskurve zu erhalten, mußten zu jeder Hämoglobin-Alkalichlorid-Lösung mit bestimmter Hämoglobinkonzentration mehrere um den Nullpunkt variierende EMK-Werte ermittelt werden. Dies erfolgte durch Austausch der Titrationslösungen in den Außenkammern; dabei kamen 5 Lösungen mit Salzkonzentrationen von 0,07 - 0,15 Mol/ kg H_2O zur Verwendung. In den Abbildungen 4 - 7 auf den Seiten 35 - 38 sind die EMK-Werte als Funktion vom dekadischen Logarithmus der mittleren Aktivität des jeweiligen Alkalichlorids in den Titrationslösungen aufgezeichnet.

Die Titrationskurve ergab dabei stets eine Gerade. Ihr Schnittpunkt mit der Linie $E = 0$ ergab den gesuchten Wert von $(a_{\pm}^{IV})_{E=0}$. Er ließ sich graphisch und rechnerisch mit Hilfe linearer Regression ermitteln.

Die lineare Abhängigkeit ließ den Schluß zu, daß die Ionenüberführungs- und Wassertransportzahlen an den Membranen im untersuchten Bereich unabhängig von der Salzkonzentration sind. Jede Nulltitration wurde zur Kontrolle mit einer ausgewechselten Hämoglobin-Alkalichlorid-Lösung gleicher Konzentration wieder-

holt, wobei die entsprechenden Spannungswerte nur geringfügig voneinander abwichen.

Nach TRETTER [60] ließen sich im Laufe einer Titration an den Hämoglobin-Salzlösungen keine Veränderungen - durch Wasser- oder Ionentransport in den Membranen - nachweisen.

Beim Meßvorgang waren folgende Fehlerquellen zu beachten:

Um beim Austausch der Titrations- und Meßlösungen Konzentrationsfehler zu vermeiden, mußten die Kammern zunächst mit der nachfolgenden Lösung gespült werden.

An den Membranflächen bilden sich statt der in Abschnitt 1 angenommenen scharfen Phasengrenzen zwischen Membran und Lösung Flüssigkeitsfilme, in denen sich die Werte der chemischen Potentiale und Transportzahlen kontinuierlich von der Membran zur Lösung hin ändern. Die Flüssigkeitsfilme senken in Abhängigkeit von ihrer Dicke die Absolutbeträge der EMK und damit auch die Steigung der Titrationsgeraden ("Filmeffekt") [44]. Wie PFISTER [44] nachweisen konnte, hat der "Filmeffekt" jedoch keinen verfälschenden Einfluß auf die Bestimmung von $(a_{\pm}^{\text{IV}})_{E=0}$.

Mit Hilfe höherer Rührgeschwindigkeiten konnte die Dicke der Flüssigkeitsfilme auf ein Minimum reduziert werden; außerdem stellten sich dadurch schneller konstante Spannungswerte ein.

Unterschiede an den Salzbrückenenden und den Thalamidelektroden erzeugten beim Eintauchen der Glaskapillaren in die gleiche Lösung eine Asymmetriespannung von ca. 0,4 mV.

Diese ließ sich jedoch eliminieren, indem die Spannung nach Vertauschen Agar-KCl-Salzbrücken in den beiden Titrationslösungen ein zweites Mal gemessen und dann der Mittelwert aus den Absolutbeträgen beider Messungen gebildet wurde.

Gemessen wurde bei einer Temperatur von $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ohne Thermostatisierung, da die Temperatur zwar die EMK (siehe Gleichung 12/2), die Bestimmung der Aktivitätskoeffizienten jedoch nur schwach beeinflusst [44].

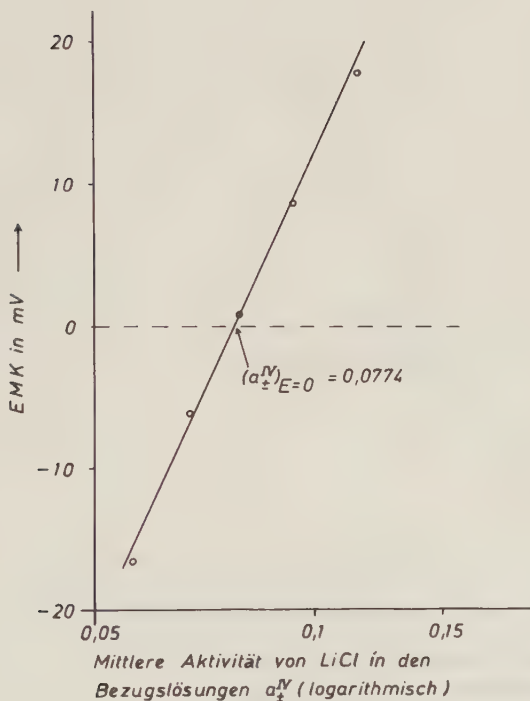


Abb. 4: Potentiometrische "Nulltitration" einer 20,34 %igen Hämoglobin-LiCl-Lösung: Elektromotorische Kraft (EMK) der Meßzelle in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der mittleren Aktivität $a_{\pm}^{IV}$ von LiCl in den Außenkammern (Titrationen).

Meßlösung: Hb-LiCl-Lösung bei pH 7,20
 $m_{\text{Hb}} = 3,959 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/kg H}_2\text{O}$
 $m_{\text{LiCl}} = 0,1 \text{ Mol/kg H}_2\text{O}$

Temperatur: $(23 \pm 1)^{\circ}\text{C}$

Steigung: $d(\text{EMK})/d \log a_{\pm}^{IV} = 103,58 \text{ mV/ Dekade}$

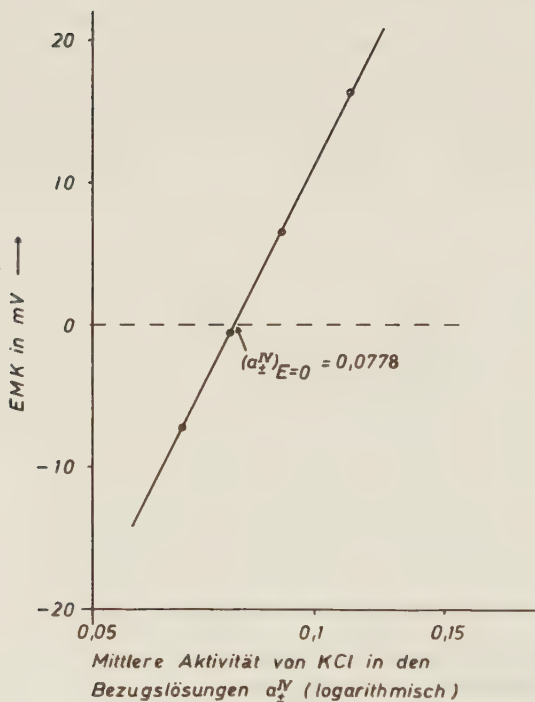


Abb. 5: Potentiometrische "Nulltitration" einer 37,00 %igen Hämoglobin-KCl-Lösung: Elektromotorische Kraft (EMK) der Meßzelle in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der mittleren Aktivität $a_{\pm}^{IV}$ von KCl in den Außenkammern $a_{\pm}^{IV}$ (Titrationslösungen).

Meßlösung: Hb-KCl-Lösung bei pH 7,21

$$m_{\text{Hb}} = 9,105 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/ kg H}_2\text{O}$$

$$m_{\text{KCl}} = 0,1 \text{ Mol/ kg H}_2\text{O}$$

Temperatur: $(23 \pm 1)^{\circ}\text{C}$

Steigung: $d(\text{EMK})/d\log a_{\pm}^{IV} = 104,51 \text{ mV/ Dekade}$

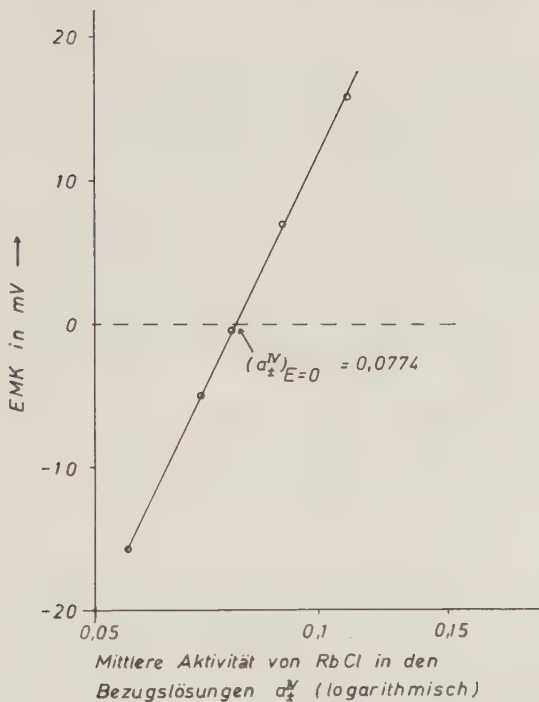


Abb. 6: Potentiometrische "Nulltitration" einer 37,00 %igen Hämoglobin-RbCl-Lösung: Elektromotorische Kraft (EMK) der Meßzelle in Abhängigkeit von dekadischen Logarithmus der mittleren Aktivität $a_{\pm}^{IV}$ von RbCl in den Außenkammern $a_{\pm}^{IV}$ (Titrationslösungen).

Meßlösung: Hb-RbCl-Lösung bei pH 7,21
 $m_{\text{Hb}} = 9,105 \cdot 10^{-3}$ Mol/ kg H_2O
 $m_{\text{RbCl}} = 0,1$ Mol/ kg H_2O

Temperatur: $(23 \pm 1)^{\circ}\text{C}$

Steigung: $d(\text{EMK})/d\log a_{\pm}^{IV} = 106,77$ mV / Dekade

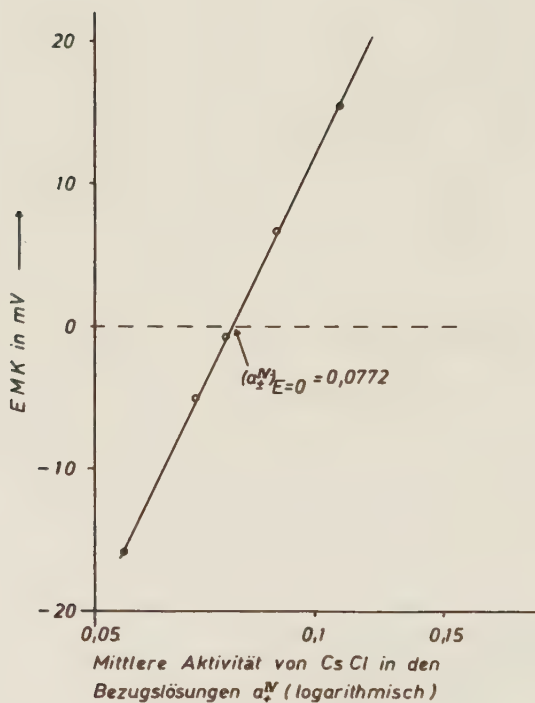


Abb. 7: Potentiometrische "Nulltitration" einer 37,00 %igen Hämoglobin-CsCl-Lösung: Elektromotorische Kraft (EMK) der Meßzelle in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der mittleren Aktivität $a_{\pm}^{IV}$ von CsCl in den Außenkammern $\pm$ (Titrationslösungen).

Meßlösung: Hb-CsCl-Lösung bei pH 7,22
 $m_{\text{Hb}} = 9,105 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/kg H}_2\text{O}$
 $m_{\text{CsCl}} = 0,1 \text{ Mol/kg H}_2\text{O}$

Temperatur: $(23 \pm 1)^{\circ}\text{C}$

Steigung: $d(\text{EMK})/d\log a_{\pm}^{IV} = 106,16 \text{ mV/ Dekade}$

Die mittleren statistischen Abweichungen der EMK-Werte von der Ausgleichsgeraden betrugen durchschnittlich:

bei LiCl-Hb-Lösungen: $\pm (0,23 \pm 0,11)$ mV

bei KCl-Hb-Lösungen: $\pm (0,28 \pm 0,09)$ mV

bei RbCl-Hb-Lösungen: $\pm (0,25 \pm 0,13)$ mV

bei CsCl-Hb-Lösungen: $\pm (0,29 \pm 0,12)$ mV

jeweils unabhängig von der Hämoglobinkonzentration der Meßlösung.

Als Steigungswerte der Titrationsgeraden ergaben sich unabhängig von der Proteinkonzentration:

bei LiCl-Hb-Lösungen: $103,31 \pm 0,92$ mV/ Dekade

bei KCl-Hb-Lösungen: $104,56 \pm 1,17$ mV/ Dekade

bei RbCl-Hb-Lösungen: $106,92 \pm 0,72$ mV/ Dekade

bei CsCl-Hb-Lösungen: $106,11 \pm 0,80$ mV/ Dekade

Die für die Alkalichloride unterschiedlichen Werte spiegeln den unterschiedlichen Einfluß der Coionen-überführung in den Ionenaustauschermembranen wider. Die Unabhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration innerhalb der angegebenen Genauigkeiten zeigt gleichzeitig die Minimalisierung der "Filmeffekte" an den Membranen und das Fehlen irreversibler Veränderungen der Membraneigenschaften durch das Hämoglobin [44].

Der relative statistische Meßfehler bei der $(a_{\pm}^{\text{IV}})_{E=0}$ - Bestimmung nach der linearen Regression betrug im Mittel, ebenfalls unabhängig von der Hämoglobinkonzentration:

bei LiCl-Hb-Lösungen: $\pm (0,28 \pm 0,15) \%$

bei KCl-Hb-Lösungen: $\pm (0,32 \pm 0,13) \%$

bei RbCl-Hb-Lösungen: $\pm (0,18 \pm 0,13) \%$

bei CsCl-Hb-Lösungen: $\pm (0,25 \pm 0,13) \%$

REBOIRAS [50] führte Kontrollmessungen durch, bei denen er die mittleren Aktivitätskoeffizienten in reinen Alkalichloridlösungen bekannter Konzentration bestimmte. Die Abweichung von den Tabellenwerten betrug dabei $\pm (0,25 \pm 0,21) \%$.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Stöchiometrische Mittlere Aktivitätskoeffizienten

Zur Beschreibung des Einflusses von Protein-Polyionen auf das chemische Potential von Salzen dient der Vergleich der mittleren Aktivitätskoeffizienten von Protein-Salz-Lösungen mit denen reiner Salzlösungen gleicher Konzentration (siehe Einleitung). Wenn für den stöchiometrischen mittleren Aktivitätskoeffizienten folgende Beziehung gilt

$$\gamma = \frac{a_{\pm}}{\sqrt{m_{+} \cdot m_{-}}}, \quad (41/1) \quad ^{+)}$$

wobei $a_{\pm}$ die mittlere Aktivität eines Alkalichlorids in der Hämoglobin-Salzlösung,

γ der stöchiometrische mittlere Aktivitätskoeffizient des Alkalichlorids in der Hämoglobin-Salz-Lösung,

m_{+}, m_{-} die Gesamtkonzentration an Kationen und Anionen in der Hämoglobin-Salz-Lösung in Mol/ kg H_2O ist,

^{+) Im Folgenden wird aus Gründen der Vereinfachung der Schreibweise der Index II zur Bezeichnung der Alkalichlorid-Hämoglobinlösung bei den Größen m , $\gamma_{\pm}$ und $a_{\pm}$ weggelassen. Ebenso wird der Index $\pm$ zur Bezeichnung des mittleren Ionenaktivitätskoeffizienten fallengelassen, da Verwechslungen im Weiteren ausgeschlossen sind.}

dann ist bei Anwendung der Nulltitration zu schreiben (siehe Gleichung 13/1):

$$\gamma = \frac{(s_+^{IV})_{E=0}}{\sqrt{m_+ \cdot m_-}} \quad (42/1)$$

Die nach Gleichung (42/1) berechneten Werte für γ in Spalte 2 der Tabellen 1 - 4 auf den Seiten 45-48 sind in den Abbildungen 8a - d auf den Seiten 51-54 in Abhängigkeit von der Hämoglobinmolalität aufgetragen.

Durch die γ -Werte der vier Salze wurden Ausgleichsgeraden berechnet.

Die stöchiometrischen Aktivitätskoeffizienten γ der Hämoglobin-Salz-Lösungen mit unterschiedlichen Salzen dividiert durch die Aktivitätskoeffizienten der reinen 0,1 molalen Salzlösungen (im Folgenden mit γ_0 bezeichnet), ergeben direkt vergleichbare Werte.

Deshalb wurden von allen γ -Werten die Quotienten

(γ/γ_0) gebildet, die in Spalte 3 der Tabellen 1 - 4 auf den Seiten 45-48 zu finden sind.

Die nun direkt vergleichbaren berechneten Ausgleichsgeraden von (γ/γ_0) sind in Abhängigkeit von der Hämoglobinmolalität in Abbildung 9, oberer Teil, dargestellt.

Die Steigungen der Ausgleichsgeraden beschreiben am deutlichsten den Einfluß des Hämoglobins auf die Ak-

tivitätskoeffizienten. Daher sind in Abbildung 9 lediglich die berechneten Ausgleichsgeraden, parallel verschoben durch den Ordinaten Schnittpunkt 1, eingezeichnet. Auf der Ordinate ist zusätzlich der maximale Bereich der "wahren" Ordinatenabschnitte angegeben.

Steigung (A) und Ordinatenabschnittswerte (B) der Ausgleichsgeraden sind in Tabelle 5 auf Seite 49 angegeben, zusammen mit ihren statistischen Fehlern (σ_A, σ_B) und der mittleren statistischen Abweichung der Meßpunkte von der Ausgleichsgeraden (Varianz S).

Zu den folgenden Tabellen 1 - 4:

Mittlere Aktivitätskoeffizienten von Alkalichloriden in isoionischen Hämoglobininlösungen bei einer Salzkonzentration von 0,1 Mol pro Kilogramm Wasser und 23°C.

m_{Hb}	Hämoglobinkonzentration in Millimol pro Kilogramm Wasser
γ	Stöchiometrischer mittlerer Aktivitätskoeffizient des Salzes in der Hämoglobininlösung
γ_w	Anteil am stöchiometrischen mittleren Aktivitätskoeffizienten des Salzes durch den Einfluß des "non-solvent"-Wassers (siehe Gleichung 57/1)
γ^*	Mittlerer Aktivitätskoeffizient des Salzes in der Hämoglobininlösung nach Korrektur für das "non-solvent"-Wasser: ($\gamma^* = \gamma / \gamma_w$)
γ_o	Mittlerer Aktivitätskoeffizient des Salzes in reiner 0,1 molaler Salzlösung; aus [13].

Tab. 1: 0,1 m LiCl + Hb isoionisch, $\gamma_0 = 0,789$

$m_{\text{Hb}}/\text{mmol kg}^{-1}$	γ	γ/γ_0	γ_w	γ^*	γ^*/γ_0
0,763	0,7942	1,0066	1,015	0,7825	0,9918
0,763	0,7833	0,9928	1,015	0,7717	0,9781
0,763	0,7796	0,9881	1,015	0,7681	0,9735
1,607	0,7846	0,9944	1,032	0,7603	0,9636
1,607	0,7799	0,9885	1,032	0,7557	0,9578
2,146	0,7889	0,9999	1,043	0,7564	0,9587
2,146	0,7744	0,9815	1,043	0,7425	0,9411
2,551	0,7817	0,9907	1,052	0,7431	0,9418
2,551	0,7749	0,9821	1,052	0,7366	0,9336
2,551	0,7761	0,9837	1,052	0,7377	0,9350
3,095	0,7946	1,0071	1,064	0,7468	0,9465
3,095	0,7751	0,9824	1,064	0,7285	0,9233
3,727	0,7803	0,9890	1,078	0,7238	0,9174
3,727	0,7774	0,9853	1,078	0,7212	0,9141
3,959	0,7941	1,0065	1,083	0,7332	0,9293
3,959	0,7741	0,9811	1,083	0,7148	0,9060
4,146	0,7759	0,9834	1,087	0,7138	0,9047
4,146	0,7741	0,9811	1,087	0,7121	0,9025
4,980	0,7933	1,0054	1,107	0,7166	0,9082
4,980	0,7734	0,9802	1,107	0,6986	0,8854
6,077	0,7788	0,9871	1,133	0,6874	0,8712
6,077	0,7745	0,9816	1,133	0,6836	0,8664
6,110	0,7774	0,9853	1,134	0,6855	0,8688
6,110	0,7726	0,9792	1,134	0,6813	0,8635
8,297	0,7745	0,9816	1,191	0,6503	0,8242
8,297	0,7709	0,9771	1,191	0,6473	0,8204
9,813	0,7708	0,9769	1,234	0,6246	0,7916
9,813	0,7605	0,9639	1,234	0,6163	0,7811
11,319	0,7701	0,9760	1,280	0,6016	0,7625
11,319	0,7667	0,9717	1,280	0,5920	0,7592

Tab. 2: 0,1 m KCl + Hb isoionisch, $\gamma_0 = 0,770$

$m_{\text{Hb}}/\text{mmol kg}^{-1}$	γ	γ/γ_0	γ_w	γ^*	γ^*/γ_0
0,816	0,7460	0,9688	1,016	0,7343	0,9536
0,816	0,7510	0,9753	1,016	0,7392	0,9600
1,723	0,7500	0,9740	1,034	0,7253	0,9419
1,723	0,7485	0,9721	1,034	0,7239	0,9401
2,347	0,7552	0,9808	1,048	0,7206	0,9358
2,347	0,7492	0,9730	1,048	0,7149	0,9284
2,736	0,7593	0,9861	1,056	0,7190	0,9338
2,736	0,7538	0,9790	1,056	0,7138	0,9270
3,403	0,7760	1,0078	1,070	0,7252	0,9418
3,403	0,7543	0,9796	1,070	0,7050	0,9156
4,035	0,7644	0,9927	1,085	0,7045	0,9149
4,035	0,7601	0,9871	1,085	0,7006	0,9099
4,373	0,7790	1,0117	1,092	0,7134	0,9265
4,373	0,7561	0,9819	1,092	0,6924	0,8992
4,475	0,7588	0,9855	1,095	0,6930	0,9000
4,475	0,7570	0,9831	1,095	0,6913	0,8978
5,533	0,7864	1,0213	1,120	0,7021	0,9118
5,533	0,7685	0,9981	1,120	0,6862	0,8912
6,645	0,7752	1,0068	1,148	0,6753	0,8770
6,645	0,7715	1,0019	1,148	0,6720	0,8727
6,645	0,7655	0,9942	1,148	0,6668	0,8660
6,645	0,7646	0,9930	1,148	0,6660	0,8649
9,105	0,7779	1,0103	1,214	0,6408	0,8322
9,105	0,7734	1,0044	1,214	0,6371	0,8274
10,904	0,7880	1,0234	1,267	0,6219	0,8077
10,904	0,7790	1,0117	1,267	0,6148	0,7984
12,578	0,7885	1,0240	1,322	0,5964	0,7745
12,578	0,7881	1,0235	1,322	0,5961	0,7742

Tab. 3: 0,1 m RbCl + Hb isoionisch, $\gamma_0 = 0,764$

$m_{\text{Hb}}/\text{mmol kg}^{-1}$	γ	γ/γ_0	γ_w	γ^*	γ^*/γ_0
0,816	0,7581	0,9923	1,016	0,7462	0,9767
0,816	0,7549	0,9881	1,016	0,7430	0,9725
1,723	0,7652	1,0016	1,034	0,7364	0,9639
1,723	0,7614	0,9966	1,034	0,7364	0,9639
2,317	0,7613	0,9979	1,047	0,7271	0,9517
2,317	0,7624	0,9965	1,047	0,7282	0,9531
2,736	0,7501	0,9818	1,056	0,7103	0,9297
2,736	0,7485	0,9797	1,056	0,7088	0,9277
2,986	0,7666	1,0034	1,061	0,7225	0,9457
2,986	0,7669	1,0038	1,061	0,7228	0,9461
4,035	0,7695	1,0072	1,085	0,7092	0,9283
4,035	0,7657	1,0022	1,085	0,7057	0,9237
4,121	0,7729	1,0116	1,087	0,7110	0,9306
4,121	0,7773	1,0174	1,087	0,7151	0,9360
4,475	0,7579	0,9920	1,095	0,6921	0,9059
4,475	0,7556	0,9890	1,095	0,6900	0,9031
5,734	0,7825	1,0242	1,125	0,6956	0,9105
5,734	0,7860	1,0288	1,125	0,6987	0,9145
6,645	0,7673	1,0043	1,148	0,6684	0,8749
6,645	0,7670	1,0039	1,148	0,6681	0,8745
6,645	0,7767	1,0166	1,148	0,6766	0,8856
6,645	0,7729	1,0116	1,148	0,6733	0,8813
7,397	0,7898	1,0338	1,167	0,6768	0,8859
7,397	0,7928	1,0377	1,167	0,6793	0,8891
9,105	0,7789	1,0195	1,214	0,6416	0,8398
9,105	0,7740	1,0131	1,214	0,6376	0,8346
10,904	0,7889	1,0326	1,267	0,6227	0,8151
10,904	0,7827	1,0245	1,267	0,6178	0,8086
12,578	0,7913	1,0357	1,322	0,5986	0,7835
12,578	0,7879	1,0313	1,322	0,5960	0,7801

Tab. 4: 0,1 m CsCl + Hb isoionisch, $\gamma_0 = 0,758$

$m_{\text{Hb}}/\text{mmol kg}^{-1}$	γ	γ/γ_0	γ_w	γ^*	γ^*/γ_0
0,816	0,7475	0,9861	1,016	0,7357	0,9706
0,816	0,7440	0,9815	1,016	0,7323	0,9661
1,723	0,7525	0,9927	1,034	0,7278	0,9602
1,723	0,7492	0,9884	1,034	0,7246	0,9559
2,317	0,7576	0,9995	1,047	0,7236	0,9546
2,317	0,7704	1,0164	1,047	0,7358	0,9707
2,736	0,7584	1,0005	1,056	0,7182	0,9475
2,736	0,7384	0,9741	1,056	0,6992	0,9224
2,736	0,7452	0,9831	1,056	0,7057	0,9310
2,986	0,7656	1,0100	1,061	0,7216	0,9520
2,986	0,7683	1,0136	1,061	0,7241	0,9553
4,035	0,7612	1,0042	1,085	0,7016	0,9256
4,035	0,7557	0,9970	1,085	0,6965	0,9189
4,121	0,7674	1,0124	1,087	0,7060	0,9314
4,121	0,7716	1,0179	1,087	0,7098	0,9364
4,475	0,7637	1,0075	1,095	0,6974	0,9201
4,475	0,7616	1,0047	1,095	0,6955	0,9175
5,734	0,7721	1,0186	1,125	0,6863	0,9054
5,734	0,7765	1,0244	1,125	0,6902	0,9106
6,645	0,7722	1,0187	1,148	0,6726	0,8873
6,645	0,7595	1,0020	1,148	0,6616	0,8728
6,645	0,7665	1,0112	1,148	0,6677	0,8809
6,645	0,7596	1,0021	1,148	0,6617	0,8730
7,397	0,7774	1,0256	1,167	0,6662	0,8789
7,397	0,7828	1,0327	1,167	0,6708	0,8850
9,105	0,7778	1,0261	1,214	0,6407	0,8453
9,105	0,7717	1,0181	1,214	0,6357	0,8387
10,904	0,7753	1,0228	1,267	0,6162	0,8129
10,904	0,7663	1,0109	1,267	0,6048	0,7979
12,578	0,7819	1,0315	1,322	0,5915	0,7803
12,578	0,7762	1,0240	1,322	0,5871	0,7745

Tab. 5: Stöchiometrische mittlere Aktivitätskoeffizienten von Alkalichloriden in isoionischen Hämoglobinslösungen:

Parameter und Standardfehler der Ausgleichsgeraden für γ/γ_0 in Abhängigkeit von der Hämoglobinsmolalität m_{Hb} :

$$\gamma/\gamma_0 = A \cdot m_{\text{Hb}} + B$$

N Anzahl der Meßpunkte

S mittlere statistische Abweichung der Meßpunkte von der Ausgleichsgeraden.

	N	A $\pm \sigma_A$	B $\pm \sigma_B$	S
LiCl	30	- (1,734 $\pm$ 0,483)	(0,9920 $\pm$ 0,0024)	$\pm$ 0,0088
KCl	28	+ (3,915 $\pm$ 0,543)	(0,9743 $\pm$ 0,0033)	$\pm$ 0,0106
RbCl	30	+ (3,828 $\pm$ 0,623)	(0,9937 $\pm$ 0,0036)	$\pm$ 0,0119
CsCl	31	+ (2,660 $\pm$ 0,620)	(0,9963 $\pm$ 0,0040)	$\pm$ 0,0114

Tab. 6: Mittlere Aktivitätskoeffizienten von Alkalichloriden in isoionischen Hämoglobinlösungen nach Korrektur für "non-solvent"-Wasser: Parameter und Standardfehler der Ausgleichsgeraden für γ^*/γ_0 in Abhängigkeit von der Hämoglobinolalität m_{Hb} :

$$\gamma^*/\gamma_0 = A^* m_{\text{Hb}} + B^*$$

N Anzahl der Meßpunkte

S* mittlere statistische Abweichung der Meßpunkte von der Ausgleichsgeraden.

	N	A* $\pm \sigma_{A^*}$	B* $\pm \sigma_{B^*}$	S*
LiCl	30	-(20,549 $\pm$ 0,420)	(0,9913 $\pm$ 0,0022)	$\pm$ 0,0081
KCl	28	-(15,955 $\pm$ 0,460)	(0,9766 $\pm$ 0,0031)	$\pm$ 0,0099
RbCl	30	-(16,465 $\pm$ 0,530)	(0,9968 $\pm$ 0,0035)	$\pm$ 0,0111
CsCl	31	-(17,406 $\pm$ 0,520)	(0,9988 $\pm$ 0,0035)	$\pm$ 0,0109

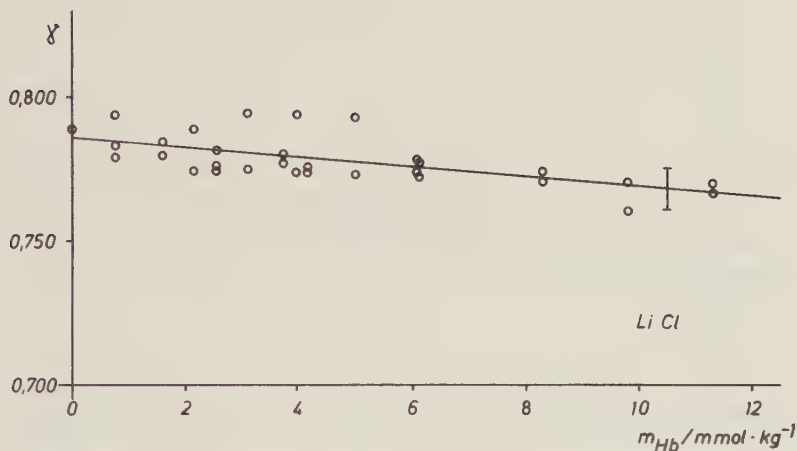


Abb. 8a: Stöchiometrischer mittlerer Aktivitätskoeffizient γ von LiCl in isoionischen Hämoglobinslösungen in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration m_{Hb} .

Meßpunkte mit Ausgleichsgerade.

┌: mittlere statistische Abweichung der Meßpunkte von der Ausgleichsgeraden

Salzkonzentration: 0,1 Mol/ kg H_2O

Punkt auf der Ordinate: mittlerer Aktivitätskoeffizient γ_0 der reinen 0,1 molalen LiCl-Lösung [13].

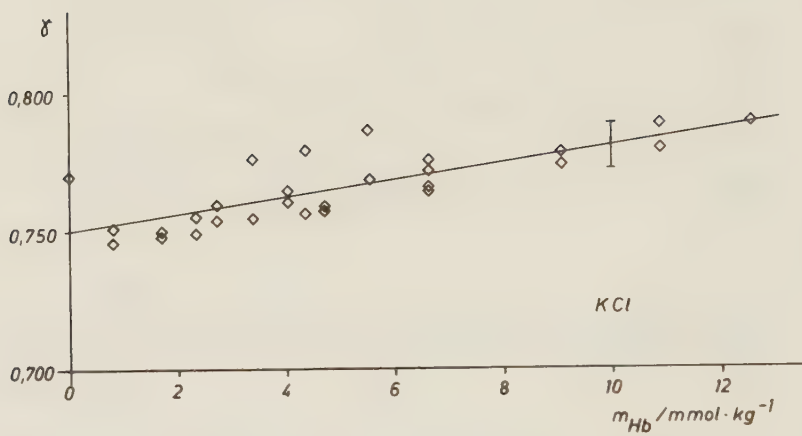


Abb. 8b: Text entsprechend Abbildung 8a, jedoch für KCl.

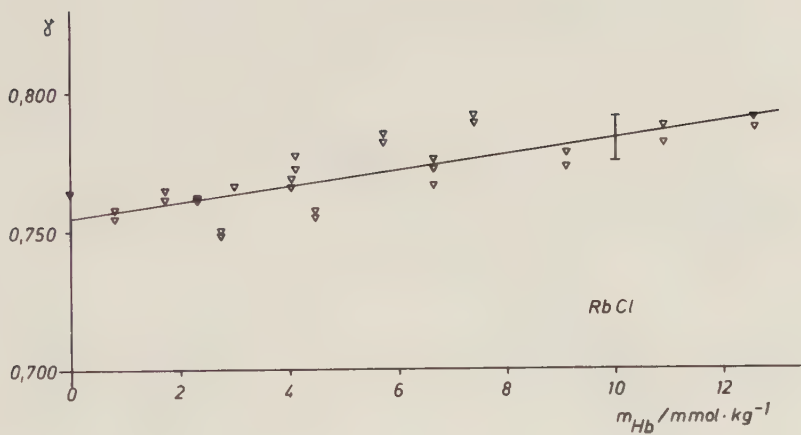


Abb. 8c: Text entsprechend Abbildung 8a, jedoch für RbCl .

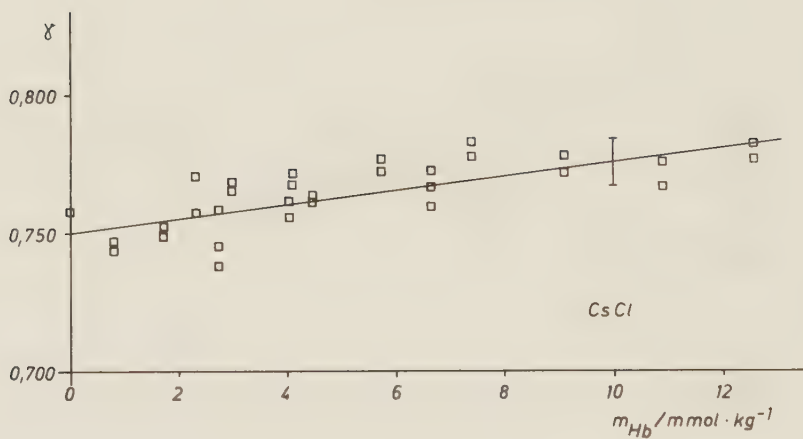


Abb. 8d: Text entsprechend Abbildung 8a, jedoch für CsCl .

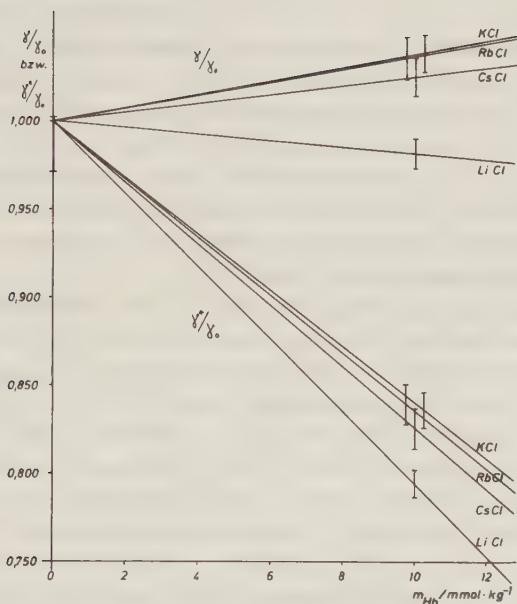


Abb. 9: Relative stöchiometrische mittlere Aktivitätskoeffizienten γ/γ_0 und relative mittlere Aktivitätskoeffizienten nach Korrektur für "non-solvent"-Wasser, γ^*/γ_0 , in isoionischen Alkalichlorid-Hämoglobinlösungen in Abhängigkeit von der Hämoglobin-Molalität m_{Hb} :

Berechnete Ausgleichsgeraden mit mittlerer statistischer Abweichung der Meßpunkte, parallel verschoben durch den Ordinatenabschnitt 1,000.

Eingezeichneter Bereich auf der Ordinate: maximale Schwankungsbreite der "wahren" Ordinatenabschnitte der Ausgleichsgeraden.

Salzkonzentration: 0,1 Mol/ kg H_2O

"Non-solvent"-Wasser: 0,3 g pro g trockenes Hämoglobin.

Definitionsgemäß müßten die Ausgleichsgeraden von (γ/γ_0) über m_{Hb} die Ordinate bei 1,00 schneiden. Bei den Salzen LiCl, RbCl und CsCl liegen die Schnittpunkte nur knapp außerhalb der Fehlergrenzen bei 1,00.

Im Vergleich dazu schneidet die Gerade von KCl viel zu tief. Es ist nicht anzunehmen, daß die γ -Werte von KCl bei Hämoglobinkonzentrationen zwischen 0 und 5 Gew.% nichtlinear von m_{Hb} abhängen.

Vielmehr ist ein systematischer Fehler zu vermuten, zumal MENGES [30] bei seinen Untersuchungen an Hämoglobin-KCl-Lösungen einen wesentlich näher bei 1,00 liegenden Schnittpunkt fand.

Wichtiger jedoch ist der Vergleich der Steigungen, denn die Steigung gibt den unmittelbaren Einfluß der zunehmenden Hämoglobinkonzentration auf (γ/γ_0) wieder (Tabelle 5 auf Seite 49).

Ähnlich verhalten sich dabei die Geraden der Salze KCl, RbCl und CsCl. Die (γ/γ_0) -Werte bei diesen drei Salzen steigen mit einer Hämoglobinkonzentration von $10 \cdot 10^{-3}$ Mol/ kg H_2O gleichmäßig um ca. 2,6 - 3,9 % an, wogegen bei LiCl ein leichter Abfall um ca. 1,8 % zu verzeichnen ist. Mit dieser Steigung nimmt LiCl eine Sonderstellung ein, die möglicherweise auf den gegenüber K^+ , Rb^+ und Cs^+ wesentlich größeren Stokes'schen Radius von Li^+ zurückzuführen ist. Dieser Effekt soll jedoch zunächst unberücksichtigt bleiben.

Viel gravierender ist die Tatsache, daß trotz hoher Hämoglobinkonzentrationen die mittleren stöchiometrischen Aktivitätskoeffizienten leicht ansteigen, bzw.

nur schwach absinken. Hohe Proteinkonzentrationen müßten doch einen großen Einfluß auf die Salzionen und somit einen stärkeren Rückgang der Ionenaktivitäten erwarten lassen.

Wären weder H_2O -Moleküle noch Salzionen am Hämoglobinmolekül gebunden, stünde also das gesamte Wasser als Lösungsmittel zur Verfügung und könnten die Ionen als getrennte kinetische Einheiten betrachtet werden, käme in γ nur der elektrostatische Einfluß der Hämoglobinmoleküle auf die Ionen und der der Ionen untereinander zum Ausdruck. γ müßte folglich bei steigender Hämoglobinkonzentration sinken. Das Ansteigen von γ deutet aber eher darauf hin, daß die oben genannten Voraussetzungen nicht gegeben sind.

Um γ richtig interpretieren zu können, soll nun der eventuelle Einfluß folgender Wechselwirkungsmechanismen auf die Meßergebnisse untersucht werden: Die Wechselwirkung der Hämoglobinmoleküle mit den H_2O -Molekülen, elektrostatische Einflüsse auf die Salzionen, sowie deren spezifische chemische Bindung am Hämoglobinmolekül.

Zur besseren Übersicht werden die drei, in Wirklichkeit nie völlig isoliert zu betrachtenden Mechanismen voneinander getrennt.

So läßt sich der gemessene stöchiometrische Aktivitätskoeffizient durch drei Faktoren ausdrücken [44]:

$$\gamma = \gamma_w \cdot \gamma_{el} \cdot \gamma_r, \quad (57/1)$$

wobei	γ	der gemessene stöchiometrische Aktivitätskoeffizient,
	γ_w	der durch die Wechselwirkung Hämoglobin - H_2O hervorgerufene,
	γ_{el}	der "elektrostatische",
	γ_v	der "chemische" Anteil am stöchiometrischen Aktivitätskoeffizienten, bedingt durch eine spezifische Bindung von Ionen am Hämoglobinmolekül ("chemischer Aktivitätskoeffizient") ist.

Die Wahl der Modelle und ihre Diskussion erfolgte in Anlehnung an PAULY [42] und PFISTER [44].

Kennt man nun aus unabhängigen Messungen den Anteil γ_w , so erhält man über Gleichung (57/1) den Anteil am stöchiometrischen Aktivitätskoeffizienten, der sich aus γ_{el} und γ_v zusammensetzt, die allein auf Wechselwirkungen zwischen Hämoglobinmolekülen und Salzionen beruhen.

3.2 Berücksichtigung der Protein-Wasser-Wechselwirkungen

Die Protein-Polyionen wirken mit ihren zahlreichen positiven und negativen Ladungsgruppen und dipolähnlichen Gruppen anziehend auf die H_2O -Dipole. Man nimmt deshalb an, daß auf diese Weise pro Gramm trockenen Hämoglobins 0,2 - 0,5 g H_2O "gebunden" werden [1,3,5,8,14,21,33,51], die als sogenanntes "non-solvent water" nicht mehr als Lösungsmittel den Salzionen zur Verfügung stehen [1,15,16,18].

In unserem Fall wurden 0,3 g gebundenes Wasser/ g Hämoglobin vorausgesetzt, die als Mantel aus 1 bis 2 Molekülschichten um das kugelförmig gedachte Hämoglobinemolekül vorstellbar sind.

Da das als Lösungsmittel verfügbare "freie Wasser" weniger wird, die Anzahl der Salzionen aber gleich bleibt, steigt die tatsächliche Salzkonzentration im Vergleich zur Einwaagekonzentration, die auf das Gesamtwasser bezogen ist, an.

Die Ionenkonzentration in Mol/ kg "freies Wasser" läßt sich errechnen aus der Beziehung

$$(m_i)_w = \frac{m_i}{(1 - \gamma \cdot m_{Hb})} \quad (59/1)$$

wobei	$(m_i)_w$	die Ionenkonzentration in Mol/ kg "freies Wasser",
	m_i	die Ionenkonzentration in Mol/ kg Gesamtwasser,
	γ	die mittlere Menge "gebundenen" Wassers in kg/ Mol Hämoglobin,
	m_{Hb}	die Hämoglobinkonzentration in Mol/ kg H_2O ist.

Unter Berücksichtigung der Wasserbindung durch Hämoglobin ergibt sich dann für den korrigierten mittleren Aktivitätskoeffizienten γ^* :

$$\gamma^* = \frac{(a_{\pm}^{\text{IV}})_{E=0}}{\sqrt{(m_+)_{\text{w}} (m_-)_{\text{w}}}} \quad (60/1)$$

Wenn nach Gleichung (59/1)

$$m_i = (m_i)_{\text{w}} \cdot (1 - \eta \cdot m_{\text{Hb}}) , \quad (60/2)$$

dann gilt eingesetzt in Gleichung (42/1):

$$\gamma = \frac{(a_{\pm}^{\text{IV}})_{E=0}}{\sqrt{(m_+)_{\text{w}} \cdot (m_-)_{\text{w}}}} \cdot \frac{1}{(1 - \eta \cdot m_{\text{Hb}})} \quad (60/3)$$

Schreibt man

$$\gamma_{\text{w}} = \frac{1}{(1 - \eta \cdot m_{\text{Hb}})} , \quad (60/4)$$

so erhält man unter Berücksichtigung von Gleichung (60/1) aus Gleichung (60/3):

$$\gamma^* = \frac{\gamma}{\gamma_{\text{w}}} \quad (60/5)$$

Außerdem gilt nach Gleichung (57/1) und (60/5):

$$\gamma^* = \gamma_{el} \cdot \gamma_v \quad (61/1)$$

γ_w wurde für die einzelnen Meßpunkte mit einem Wert von $\eta = 19,35 \text{ kg H}_2\text{O/ Mol Hämoglobin}$, entsprechend $0,3 \text{ g "non-solvent"-Wasser pro Gramm trockenes Hämoglobin}$, berechnet. Maximal erreichte γ_w den Wert von $1,322$ (siehe Tabellen 1 - 4).

Die Werte für die korrigierten mittleren Aktivitätskoeffizienten γ^* sind in Spalte 5 der Tabellen 1 - 4 auf den Seiten 45 - 48 aufgeführt.

Die in Abbildung 9, unterer Teil, über m_{Hb} aufgetragenen (γ/γ_0)-Werte aus Spalte 6 der Tabellen 1 - 4 ergeben eine Ausgleichsgerade, die die Ordinate bei $1,00$ schneiden sollte, um damit die lineare Näherung für γ^* als Funktion von m_{Hb} zu rechtfertigen.

Die Werte für die Steigungen (A^*) und Ordinatenabschnitte (B^*) aus der Ausgleichsrechnung für (γ/γ_0) in Abhängigkeit von m_{Hb} sind zusammen mit ihren statistischen Fehlern (σ_{A^*} , σ_{B^*}) und mit der mittleren statistischen Abweichung der Meßpunkte von den Ausgleichsgeraden (S^*) in Tabelle 6 auf Seite 50 angegeben.

Wie bei (γ/γ_0) schneiden die Geraden für LiCl, RbCl und CsCl nur knapp außerhalb des Fehlerbereichs neben $1,00$, während der Schnittpunkt von KCl auf Grund des als wahrscheinlich angenommenen systematischen Fehlers viel tiefer schneidet.

Der lineare Abfall der (γ^*/γ_0)-Werte bei einer

Hämoglobinkonzentration von $10 \cdot 10^{-3}$ Mol/ kg H_2O schwankt zwischen ca. 15 % für KCl und ca. 20,5 % für LiCl.

SCHMID [55] fand bei den Kaliumhalogeniden und gleicher Hämoglobinkonzentration ein Absinken der (γ^*/γ_0) -Werte zwischen ca. 15 % (für KF) und ca. 28 % (für KJ). Die hier gefundene relativ kleine Steigungsdifferenz bei gleichbleibendem Anion läßt eine hauptsächliche Beteiligung des Anions, hier des Cl^- -Ions an den Wechselwirkungen zwischen Hämoglobinmolekülen und Salzionen wahrscheinlich erscheinen.

Dabei kann ein gewisser Einfluß der Kationen nicht ausgeschlossen werden, der in den Steigungsunterschieden, am Auffälligsten bei LiCl, zum Ausdruck kommt. Zu entsprechenden Ergebnissen kam auch REBOIRAS [50], der die Aktivitätskoeffizienten der hier verwendeten Alkalichloride in Rinderserumalbuminlösungen untersuchte.

Doch zunächst zu den Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Wasser:

Die mittleren Aktivitätskoeffizienten γ^* nehmen in ca. 45 %iger (entspricht ca. $12 \cdot 10^{-3}$ Mol/ kg H_2O) Hämoglobinlösung um etwa 20 %, bei LiCl sogar um 25 % gegenüber reinen 0,1 molalen Salzlösungen ab. Die um ca. 20 % niedrigeren mittleren molalen Aktivitätskoeffizienten entsprächen denen reiner Salzlösungen folgender Konzentration:

bei KCl: $\approx 1,3$ m

bei RbCl: $\approx 0,8$ m

bei CsCl: $\approx 0,6$ m

Der um ca. 25 % erniedrigte Aktivitätskoeffizient von LiCl wird in einer reinen LiCl-Lösung nie erreicht.

Daraus ist zu erkennen, daß das Abfallen von γ^* in keinem Zusammenhang mit der Salzkonzentrationserhöhung bis auf 0,13 Mol/ kg H₂O (für $\gamma_w = 1,322$ bei 44,76 Gew.% Hämoglobin) durch den "non-solvent-water"-Effekt stehen kann. Entscheidend muß somit der "direkte" Einfluß der Hämoglobinmoleküle auf die Salzionen sein.

γ^* beschreibt diese "direkten" Wechselwirkungen und beinhaltet sowohl den elektrostatischen Anteil γ_{el} , als auch den der spezifischen Ionenbindung am Hämoglobinmolekül.

Eine getrennte Bestimmung beider Größen allein aus den Meßergebnissen der vorliegenden Arbeit ist nicht möglich. Setzt man jedoch einen Faktor als gegeben voraus, so läßt sich der andere an Hand der Meßwerte berechnen.

3.3 γ^* als "elektrostatischer" Aktivitätskoeffizient

Die Annahme, daß die Hämoglobinmoleküle in isoionischer Lösung keine Kationen oder Anionen spezifisch binden, läßt γ_v gleich 1 werden.

Dann gilt nach Gleichung (60/5) und (61/1)

$$\gamma^* = \frac{\gamma}{\gamma_w} = \gamma_{el} \quad (64/1)$$

Um auf seine weitere Umgebung elektrostatisch wirken zu können, müßte das Hämoglobinmolekül entweder eine starke Nettoladung oder Dipolcharakter aufweisen. Die gemessenen pH-Werte von 7,20 bis 7,22 liegen jedoch so nahe am isoelektrischen Punkt von Hämoglobin, daß die Nettoladung mit Null angenommen werden kann und somit die Existenz eines elektrischen Monopolfeldes ausscheidet. Die etwa 100 positiven und 100 negativen Ladungsgruppen des Hämoglobinmoleküls sind am isoelektrischen Punkt nahezu gleichmäßig über seine ganze Oberfläche verteilt [35]. Sie können deshalb nur ein, mit dem Abstand vom Molekül steil abfallendes Multipolfeld aufbauen, das ohne wesentliche Wirkung auf die Salzionen bleibt. Denkt man sich die Ladungsgruppen des Protein-Polyions als isolierte, regelmäßig verteilte und in die Umgebungsstruktur eingefügte Einheiten - gewissermaßen wie frei in Lösung befindliche Ionen - so würden die insgesamt 200 Ladungsgruppen pro Molekül eine Ionenstärke von maximal 1,3 Mol/ kg H₂O bei einer Hämoglobinkonzentration von ca. $13 \cdot 10^{-3}$ Mol/ kg H₂O ergeben. Vergleicht man die Literaturwerte der Aktivitätskoeffizienten 1,3 molaler Alkalichlorid-Lösungen mit den experimentell gefundenen Werten, so wird deutlich

daß außer bei KCl kein Wertepaar übereinstimmt und somit ionenähnliche Ladungsgruppen unwahrscheinlich sind:

	γ für reine 1,3 molale Salzlösungen [13]	γ^* bei ca. $13 \cdot 10^{-3}$ Mol Hb/ kg H ₂ O
LiCl	0,810	0,600
KCl	0,590	0,596
RbCl	0,568	0,598
CsCl	0,523	0,590

Abstandsberechnungen benachbarter positiver oder negativer Ladungsgruppen auf der kugelförmig gedachten Hämoglobinmoleküloberfläche ergaben einen Abstand von nur 10 Å [30] und ließen ebenfalls keine störungsfreie Einordnung dieses Modells in die Struktur einer 0,1 molalen Salzlösung mit einem mittleren Ionenabstand von 25 Å [30] zu.

Es dürfte folglich an den Tatsachen vorbeiführen,

γ^* als rein "elektrostatischen" Aktivitätskoeffizienten aufzufassen. Ich schließe damit jedoch einen "elektrostatischen" Anteil an γ^* nicht völlig aus und möchte an anderer Stelle noch einmal näher darauf eingehen.

Doch zunächst noch eine andere Variante der Interpretation der γ^* -Werte:

3.4 γ^* als "chemischer" Aktivitätskoeffizient

Hierbei wird versucht, die Erniedrigung des mittleren Aktivitätskoeffizienten allein durch die spezifische Bindung von Ionen am Hämoglobinmolekül zu erklären.

Während die Bindung von einwertigen Kationen an Proteinen im Bereich des isoelektrischen Punktes ausgeschlossen werden kann, wird die Bindung einwertiger Anionen mehrfach beschrieben [57].

Bis vor Kurzem konnten keine Hinweise auf eine auffällige [2,10], in einigen Arbeiten jedoch als wahrscheinlich angenommene [30,49] Bindung von Cl^- -Ionen am Hämoglobinmolekül im isoelektrischen Zustand gefunden werden.

Erst TRETTER [60] erbrachte in seiner Arbeit den Nachweis, daß mit einer spezifischen Cl^- -Ionenbindung an Hämoglobinmoleküle zu rechnen ist.

Er führte sowohl Aktivitätsmessungen, als auch pH-Messungen an NaCl-Hämoglobin-Lösungen durch, wobei die Hämoglobinkonzentration konstant bei 37 Gew.% gehalten, die NaCl-Konzentration jedoch zwischen 0,01 und 0,5 Mol/ kg H_2O verändert wurde.

An Hand der Ergebnisse beider Untersuchungen wurden auf zwei voneinander unabhängigen Wegen Bindungszahlen für Cl^- -Ionen am Hämoglobin berechnet, die sehr gut miteinander übereinstimmten.

Die überwiegend qualitativen Annahmen von RAU [49] und MENGES [30], daß eine Cl^- -Ionenbindung am Hämoglobinmolekül besteht, konnten damit in einen quantitativen Rahmen gestellt werden.

SCHMID [55] zeigte, daß die Steigungsunterschiede der Ausgleichsgeraden von (γ/γ_0) bei den Kalium-Halogeniden wesentlich größer sind, als bei den Alkalichloriden, und das, obwohl bei den verschiedenen Kationen die Stokes'schen Ionenradien ebenso variieren wie bei den verschiedenen Anionen.

Unterschiedliche Ionenradien sollten aus geometrischen Gründen unterschiedliche spezifische Bindungen am Hämoglobinmolekül, also auch Steigungsunterschiede bei (γ/γ_0) in Abhängigkeit von m_{Hb} erwarten lassen. Da diese jedoch bei den Alkalichloriden, verglichen mit den Kalium-Halogeniden wesentlich geringer ausfallen, läßt sich der Schluß ziehen, daß die Kationen an γ_ν nur einen sehr kleinen Anteil haben und dieser damit vernachlässigt werden kann.

Auf Grund der Ergebnisse erscheint die von mehreren Autoren beschriebene Annahme [30,49,60] einer spezifischen Cl^- -Ionenbindung am Hämoglobinmolekül sinnvoll.

Im Modellfall wird jetzt der Einfluß eines vom Hämoglobinmolekül ausgehenden elektrostatischen Feldes ausgeschlossen, also γ_{el} gleich dem mittleren Aktivitätskoeffizienten γ_0 einer reinen Alkalichloridlösung gleicher Molalität gesetzt:

$$\gamma^* = \frac{\gamma}{\gamma_w} = \gamma_0 \cdot \gamma_\nu \quad (67/1)$$

Die Anzahl der spezifisch gebundenen Cl^- -Ionen (ν_{Cl^-}) kann nun aus γ_ν wie folgt ermittelt werden:

Aus der angenommenen Bindung von Cl^- -Ionen ergibt sich die neue molale Cl^- -Ionenkonzentration

$$(\text{m}_{\text{Cl}^-})_{\text{fr}} = (\text{m}_{\text{Cl}^-})_{\text{w}} - (\nu_{\text{Cl}^-}) (\text{m}_{\text{Hb}})_{\text{w}} , \quad (68/1)$$

wobei $(\text{m}_{\text{Cl}^-})_{\text{fr}}$ die freie Chloridkonzentration in Mol/ kg "freies" Wasser,
 $(\text{m}_{\text{Cl}^-})_{\text{w}}$ die stöchiometrische Chloridkonzentration in Mol/ kg "freies" Wasser,
 (ν_{Cl^-}) die Anzahl der im Mittel pro Hämoglobinmolekül gebundenen Chloridionen und
 $(\text{m}_{\text{Hb}})_{\text{w}}$ die Hämoglobinkonzentration in Mol/ kg "freies" Wasser ist.

Hierbei wird vorausgesetzt, daß (ν_{Cl^-}) nicht von der Hämoglobinkonzentration abhängt.

Aus Gleichung (68/1) ergibt sich:

$$(\text{m}_{\text{Cl}^-})_{\text{w}} = (\text{m}_{\text{Cl}^-})_{\text{fr}} \cdot \frac{1}{(1 - (\nu_{\text{Cl}^-}) \cdot \frac{(\text{m}_{\text{Hb}})_{\text{w}}}{(\text{m}_{\text{Cl}^-})_{\text{w}}})} , \quad (68/2)$$

Gleichung (68/2) eingesetzt in Gleichung (60/3) ergibt:

$$\gamma^* = \frac{(a_{\pm}^{IV})_{E=0}}{\sqrt{(m_-)_{fr} (m_+)_{fr}}} \cdot \sqrt{\left(1 - (\nu_{Cl^-}) \frac{(m_{Hb})_w}{(m_-)_w}\right)} \cdot \frac{1}{(1 - \eta \cdot m_{Hb})}.$$

(69/1)

Unter der Annahme, daß keine Kationen an Hämoglobinmolekülen gebunden werden, gilt: $(m_+)_{w} = (m_+)_{fr}$.

Der erste Term in Gleichung (69/1) entspricht dem elektrostatischen Aktivitätskoeffizienten γ_{el} , der hier gleich γ_0 gesetzt wird.

Für γ_0 wurden die für 0,1 molale reine Salzlösungen gültigen Werte eingesetzt [13]:

für LiCl: 0,789

für KCl: 0,770

für RbCl: 0,764

für CsCl: 0,758

Für m_- steht in allen Fällen der Wert 0,1.

γ_w wird nach Gleichung (60/3) durch den letzten Term beschrieben.

Für γ_v ergibt sich demnach:

$$\gamma_v = \sqrt{\left(1 - (\nu_{Cl^-}) \frac{(m_{Hb})_w}{(m_-)_w}\right)} = \sqrt{\left(1 - (\nu_{Cl^-}) \frac{m_{Hb}}{m_-}\right)}.$$

(69/2)

Nach Einsetzen in Gleichung (67/1) erhält man:

$$\gamma^* = \frac{\gamma}{\gamma_w} = \gamma_0 \cdot \sqrt{\left(1 - \left(\nu_{\text{Cl}^-}\right) \frac{m_{\text{Hb}}}{m_-}\right)} \quad (70/1)$$

Um aus den Ergebnissen für γ^* (Tabellen 1 - 4) die im Mittel pro Hämoglobinmolekül gebundenen Cl^- -Ionen (ν_{Cl^-}) bestimmen zu können, wird Gleichung (70/1) umgeformt zu:

$$\left(\frac{\gamma^*}{\gamma_0}\right)^2 = 1 - \left(\nu_{\text{Cl}^-}\right) \left(\frac{m_{\text{Hb}}}{m_-}\right) \quad (70/2)$$

Die (ν_{Cl^-})-Werte wurden mit Hilfe der Ausgleichsrechnung entsprechend Gleichung (70/2) als Steigungswerte erhalten. Sie sind zusammen mit ihren statistischen Fehlern und mit den Stokes'schen Kationenradien in Tabelle 7 angegeben.

Tab. 7: Zahl der im Mittel gebundenen Cl^- -Ionen pro Hämoglobinmolekül in Alkalichlorid-Hämoglobin-Lösungen ($m_{\text{XCl}} = 0,1$).

	ν_{Cl^-}	$\sigma_{\nu_{\text{Cl}^-}}$	Stokes'sche Kationenradien [31]
LiCl	3,90	$\pm 0,04$	2,36
KCl	3,42	$\pm 0,08$	1,21
RbCl	3,17	$\pm 0,04$	1,16
CsCl	3,21	$\pm 0,04$	1,155

Das Absinken von γ^* bei steigender Hämoglobinkonzentration läßt sich also durch spezifische Bindung von 3 - 4 Cl^- -Ionen am Hämoglobinmolekül erklären.

Die Differenzen bei den Cl^- -Bindungszahlen, vor allem bei LiCl deuten jedoch an, daß die Cl^- -Bindung nicht der einzige, die Ionenaktivität mindernde Effekt sein kann.

3.5 Kationenspezifischer Effekt

Betrachtet man die Ausgleichsgeraden (γ^*/γ_0) über m_{Hb} (Abbildung 9), so ist leicht festzustellen, daß die Ionenaktivität von LiCl mit zunehmender Hämoglobinkonzentration signifikant steiler abfällt als die der drei anderen Salze.

Vergleicht man die Stokes'schen Kationenradien, so sieht man, daß Li^+ mit Abstand den größten hat, während bei den übrigen Kationen entsprechend den geringeren Steigungsunterschieden auch die Ionenradien weniger differieren. Es hat also den Anschein, daß neben der spezifischen Cl^- -Bindung am Hämoglobinmolekül noch ein anderer Effekt hereinspielt, der von der Kationengröße abhängt. Daß hier keine spezifische chemische Kationenbindung vorliegt, belegen die Ergebnisse aus anderen Arbeiten:

So stellte TRETTER fest [60], daß in Hämoglobinlösungen gleicher Konzentration mit zunehmender NaCl -Konzentration der elektrostatische Anteil an γ^* wächst.

Er führte das auf die steigende Zahl der negativen Ladungen am Hämoglobinmolekül durch die Bindung von Cl^- -Ionen zurück. Bei einer NaCl -Konzentration von $0,1 \text{ Mol/kg H}_2\text{O}$ schrieb er γ_{el} einen Anteil von 25 % an γ^* zu.

SCHMID [55] kam bei seinen Messungen zu dem Ergebnis, daß die Zahl der am Hämoglobinmolekül gebundenen Anionen beim kleinsten Halogenidion, J^- , wesentlich größer ist als beim größten, F^- .

Der genau umgekehrte Effekt tritt bei den Alkaliionen auf. Hier wird LiCl mit dem größten Kationenradius am stärksten vom Hämoglobinmolekül beeinflusst, während KCl , RbCl und CsCl mit ihren kleineren Kationenradien weniger beeinflusst werden. Entsprechende Ergebnisse erzielt auch REBOIRAS bei Aktivitätsmessungen an Alkalichloriden in Rinderserumalbuminlösungen [50].

Es müssen also zwei verschiedene Wechselwirkungsmechanismen zwischen den Hämoglobinmolekülen und den Salzionen existieren, wobei der eine mehr auf Kationen, der andere mehr auf Anionen anspricht. Der größere Anteil wird der spezifischen Bindung von Anionen, im vorliegenden Fall von Cl^- -Ionen, am Hämoglobinmolekül zufallen, wie die Untersuchungen TRETTERS [60] gezeigt haben und wie aus den größeren Unterschieden der (γ^*/γ_0) -Werte über m_{Hb} bei den Kaliumhalogeniden geschlossen werden kann. Die Bindung von Anionen am Hämoglobinmolekül scheint wegen des beschränkten Platzangebotes stärker von den Ionenradien abzuhängen, als der wahrscheinlich elektrostatische Einfluß auf die Kationen.

Dieser nicht zu vernachlässigende elektrostatische Anteil an γ^* dürfte auf Grund der überschüssigen negativen Ladungen am Hämoglobinmolekül auf die Kationen wirken, wie die leicht unterschiedlich abfallenden Ionenaktivitäten bei LiCl, KCl, RbCl und CsCl erkennen lassen.

Man könnte sich die Unterschiede in der Beeinflussung der verschiedenen Anionen bzw. Kationen durch das Hämoglobinmolekül vereinfacht wie folgt vorstellen:

Die Anionen mit kleinem Stokes'schen Ionenradius werden deshalb stärker beeinflusst, weil sie leichter Platz finden am Hämoglobinmolekül und somit mehr gebunden werden können. Dieser Effekt ist, wie die Ergebnisse von SCHMID [55] zeigen, deutlich ausgeprägt. Der wesentlich geringere kationenspezifische Effekt [55] könnte hingegen auf die unterschiedlichen Einflüsse der Alkaliionen auf die Struktur des Wassers zurückgehen. Das Li^+ -Ion reduziert die Translationsbeweglichkeit der Wassermoleküle in seiner nächsten Umgebung, was zu einer effektiven Bindung der benachbarten Wassermoleküle führt ("positive hydration" [52]), während K^+ , Rb^+ und Cs^+ die Translationsbewegung der Wassermoleküle in ihrer Umgebung erhöhen ("negative hydration" [52]). Daher ist die Beweglichkeit der Wassermoleküle in Lösungen, die Li^+ -Ionen enthalten, stärker eingeschränkt, wodurch das den Makromolekülen zur "Bindung" zur Verfügung stehende Lösungswasser verringert sein könnte. Da in den obigen Berechnungen (siehe Seite 58 - 59)

jedoch angenommen worden war, daß das protein-"gebundene", "non-solvent"-Wasser unabhängig von der Alkalichloridspezies in der Lösung ist, müßte dieser Effekt zu einer, der Hämoglobinkonzentration proportionalen Unterschätzung des korrigierten Aktivitätskoeffizienten γ^* für LiCl im Vergleich zu KCl, RbCl und CsCl führen und würde so die gefundenen niedrigeren γ^* -Werte für LiCl erklären.

4. Fehlerbetrachtung

Aus der Meßunsicherheit der EMK-Werte von $\pm 0,15$ mV (siehe Seite 31) erhält man nach Gleichung (42/1) eine Genauigkeit der $(a_{\pm}^{\text{IV}})_{E=0}$ -Bestimmung von $\pm 0,20$ %, wenn man einen Steigungswert der Funktion $E = f(\log a_{\pm}^{\text{IV}})$ von etwa 100 mV/Dekade (siehe Seite 13 und 39) und 5 Meßpunkte pro Bestimmung voraussetzt. Zusammen mit der Unsicherheit der Salzkonzentrations-einstellung von $\pm 0,1$ % (siehe Seite 22/23) ergibt sich nach den Gleichungen (42/1) und (60/5) eine theoretische Genauigkeit der Bestimmung von γ , (γ/γ_0) und (γ^*/γ_0) von $\pm 0,22$ %.

Die in Spalte 2 von Tabelle 8 angegebenen gemittelten relativen experimentellen Fehler der Einzelmeßpunkte für γ^* , berechnet aus den statistischen Meßfehlern von $(a_{\pm}^{\text{IV}})_{E=0}$ und dem relativen Fehler in der Salzkonzentration von $\pm 0,1$ %, stimmen gut mit diesem Wert überein.

Spalte 3 von Tabelle 8 zeigt als Maß für die Reproduzierbarkeit die mittleren relativen Standardabweichungen einzelner γ^* -Werte aus Mehrfachbestimmungen. Mit einer Ausnahme (RbCl) liegen diese Zahlen deutlich über der theoretischen Meßgenauigkeit (s.o.) und den experimentellen Fehlern. Dies deutet auf eine nicht erkannte Fehlerquelle in der Salzkonzentration hin, die z.B. im Restionengehalt der entionisierten Hämoglobin-Stammlösung (siehe Seite 20) liegen könnte.

Die maximalen relativen mittleren statistischen Ab-

weichungen der Meßpunkte von den Ausgleichsgeraden für γ^* bzw. (γ^*/γ_0) in Abhängigkeit von der Hämoglobinemolalität m_{Hb} (S^*/γ^* in Spalte 4 von Tabelle 8) schließlich zeigen, daß ein linearer Zusammenhang von γ^* bzw. (γ^*/γ_0) und m_{Hb} statistisch nicht streng gesichert ist, also nur in, wenn auch guter, Näherung gelten kann.

Tab. 8: Zusammenstellung der Fehler von γ^*

	$\frac{\sigma_{\gamma^*/\gamma^*}}{\%}$	$\frac{\sigma/\bar{\gamma}^*}{\%}$	$\frac{S^*/\gamma^*}{\%}$
LiCl	$\pm 0,30$	$\pm 0,81$	$\leq \pm 1,07$
KCl	$\pm 0,34$	$\pm 0,76$	$\leq \pm 1,28$
RbCl	$\pm 0,21$	$\pm 0,32$	$\leq \pm 1,42$
CsCl	$\pm 0,27$	$\pm 0,58$	$\leq \pm 1,41$

$\sigma_{\gamma^*/\gamma^*}$

Mittelwert der relativen experimentellen Fehler für Einzelbestimmungen von γ^* , in %.

$\sigma/\bar{\gamma}^*$

Mittelwert der relativen Standardabweichung einzelner γ^* -Meßwerte vom Mittelwert $\bar{\gamma}^*$, in %.

S^*/γ^*

Relative mittlere statistische Abweichung der experimentellen γ^* -Werte von den Ausgleichsgeraden für γ^* in Abhängigkeit von der Hämoglobinemolalität m_{Hb} (vgl. Abb.9), in %.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die mittleren Aktivitätskoeffizienten von Alkalichloriden in konzentrierten Hämoglobinslösungen bestimmt. Die Ergebnisse sind eine Ergänzung zu anderen Arbeiten, die sich mit dem Zustand der kleinen Ionen im Zytoplasma befassen.

In den Meßlösungen wurden LiCl, KCl, RbCl und CsCl mit der gleichbleibenden Konzentration von 0,1 m / kg H₂O, sowie Hämoglobin mit Konzentrationen zwischen 5 Gew.% und 45 Gew.% verwendet.

Die Salze LiCl, RbCl und CsCl kommen zwar nicht im Zytoplasma des Erythrozyten vor; es ließ sich jedoch der Einfluß unterschiedlicher Kationen mit ihren voneinander verschiedenen Ionenradien gut beobachten. Aus den Messungen ergaben sich mit zunehmender Hämoglobinkonzentration linear leicht ansteigende, nur im Beispiel LiCl abfallende stöchiometrische mittlere Aktivitätskoeffizienten.

Diese werden durch die Annahme von 0,3 g "non-solvent"-Wasser pro Gramm Hämoglobin korrigiert. Die sich nun ergebenden, mit zunehmender Hämoglobinkonzentration linear abfallenden Aktivitätskoeffizienten ließen sich mit hauptsächlich "chemischen" Wechselwirkungen zwischen Hämoglobinmolekül und Cl⁻-Ionen interpretieren. Dabei bestätigten die annähernd parallel abnehmenden Aktivitätskoeffizienten der vier Alkalichloride wieder die schon früher aufgestellte [30,49], durch TRETTERS Arbeit [60] erhärtete Annahme einer spezifischen Cl⁻-Ionenbindung am Hämoglobinmolekül.

Wie aus TRETTERS Arbeit [60] ersichtlich, ist die Cl^- -Ionenbindung bei der hier verwendeten Salzkonzentration von 0,1 m/ kg H_2O zu etwa 75 % an der Senkung der Aktivitätskoeffizienten beteiligt. Die restlichen 25 % werden einem elektrostatischen, durch die negative Nettoladung des mit 3 - 4 Cl^- -Ionen beladenen Hämoglobinmoleküls hervorgerufenen Effekt zugeschrieben.

Der Vergleich der von SCHMID [55] gefundenen Ergebnisse mit denen der vorliegenden Arbeit ließ ebenfalls diese zwei Wechselwirkungsmechanismen vermuten. Es zeigte sich auch, daß die spezifische Cl^- -Ionenbindung am Hämoglobinmolekül gegenüber dem elektrostatischen Effekt wesentlich stärker ins Gewicht fallen dürfte. Die Senkung der Aktivitätskoeffizienten gegenüber denen reiner Salzlösungen betrug nach Berücksichtigung von "non-solvent" Wasser in einer ca. 45 %igen Hämoglobininlösung zwischen 20 % und 24 %, bei der physiologischen Hämoglobinkonzentration von ca. 37 Gew.% nur 17 - 21 %.

Folglich darf der größte Teil der kleinen Ionen als "frei" in Lösung angenommen werden.

Zu den gleichen Befunden kamen MENGES [30], RAU [49] und TRETTER [60] bei Untersuchungen an Hämoglobin-KCl- bzw. Hämoglobin-NaCl-Lösungen, sowie PFISTER [44,46,47], RÄMISCH [48] und REBOIRAS [50], die Aktivitätsmessungen an hochkonzentrierten Rinderserumalbumin-KCl-, Rinderserumalbumin-NaCl-, bzw. Rinder-serumalbumin-Alkalichlorid-Lösungen durchführten. SCHMID [55] erhielt bei Messungen der Ionenaktivität

verschiedener Halogenide in Hämoglobinlösungen wechselnder Konzentration bei unterschiedlichen Anionendurchmessern auf Grund chemischer Bindungen voneinander deutlich verschiedene Änderungen der Aktivitätskoeffizienten. Damit stützte er die These von spezifischen Wechselwirkungen zwischen Hämoglobinmolekülen und einwertigen Anionen, in unserem Fall Cl^- -Ionen. Im Gegensatz dazu waren in der übrigen Literatur [11,12,32] keine Hinweise auf eine Cl^- -Bindung am Hämoglobinmolekül in isoionischer Lösung zu finden. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß in den damaligen Untersuchungen Hämoglobinlösungen wesentlich geringerer Konzentration als in den oben genannten und der hier vorliegenden Arbeit zur Verwendung kamen.

Der beobachtete geringfügige kationenspezifische Effekt, mit einer stärkeren Erniedrigung des Aktivitätskoeffizienten von LiCl , könnte auf die unterschiedlichen Wechselwirkungen des Li^+ -Ions mit dem Wasser zurückgehen.

Wie aus zahlreichen Untersuchungen [37-41,9,25,5,33,21] ersichtlich, weichen die elektrischen und thermodynamischen Eigenschaften des Zytoplasmas lebender Zellen nur unerheblich von denen konzentrierter Makromolekül-Salzlösungen ab (s. [36]).

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit darf also auch im Zytoplasma des Erythrozyten der größte Teil der kleinen Ionen als "ungebunden" betrachtet werden.

6. Literaturverzeichnis

1. G.S.Adair, M.E.Adair: Proc.Roy.Soc.(London) A90 (1947), 341
2. H.Aebi: Einführg i.d.prakt.Biochem., Karger, Germering (München), (1965), 220
3. C.H.Amberg: J.Amer.Chem.Soc.79 (1957) 3980
4. P.Andrews: Biochem.J.91 (1964), 222
5. E.L.Andronikashvili, G.M.Mrevlishvili, P.L.Privalov: in L.P.Kayushin (Ed.), "Water in biol.Systems", übersetzt a.d.Russ., Consultants, N.Y.(1969), p.63
6. R.L.Berger: Human Isoionic Hemogl.: Preparation and Kinetic Properties, Univ.of Calif., San Diego LaJolla, Anal.Let.6(2) 125-138 (1973)
7. J.Bernhardt: Phys.Chem.79 (1975), 584
8. H.B.Bull, K.Breese: Arch.Biochem.Biophys.128 (1968), 488
9. W.H.Bunch, G.Kallsen: Sci.164 (1969), 1178
10. C.W.Carr: Ann.N.Y.Acad.Sci.148 (1968), 180
11. C.W.Carr: Arch.Biochem.Biophys.44 (1953), 417
12. C.W.Carr: Arch.Biochem.Biophys.62 (1956), 476
13. B.E.Conway: "Electrochem.Data", Elsevier Publ.Comp., Amsterdam, Houston, London, N.Y.(1952)

14. D.J.Cox, V.N.Schumaker: J.Amer.Chem.Soc.83
(1968),110
15. D.A.T.Dick: "Cell Water",Butterworth,
London,(1966),p.36ff.
16. D.L.Drabkin: J.Biol.Chem.164 (1946),703
17. D.L.Drabkin: J.Biol.Chem.185 (1950),231
18. C.M.Gary-Bobo: J.Gen.Physiol.50 (1967),2547
19. J.H.B.George, J.Electrochem.Soc.117
C.R.Schlaikjer,R.A.Horne:(1970),892
20. E.A.Guggenheim: "Thermodynamics",North
Holland Publ.Comp.,Amster-
dam (1959),p.386ff.
21. G.Hasl, H.Pauly: Biophys.7 (1971),283
22. F.Helferich: Disc.Farad.Soc.21 (1956),83
23. J.A.Hinson,
Th.L.McMeekin: Biochem.a.Biophys.Research
Communic.35 (1969),94,95
24. G.Kortüm: "Lehrb.d.Elektrochem.",Verl.
Chemie,Weinheim/Bergstr.
(1966),p.135,S.270
25. M.J.Kushmerick,
R.J.Podolsky: Sci.166 (1969),1297
26. G.N.Ling: "A Phys.Theory of the Liv.
State;The Assoc.-Induct.
Hypoth.",Blaisdell,N.Y. (1962)
Ann.N.Y.Acad.Sci.125
(1965),401
27. G.N.Ling: Sci.163 (1969),1335
28. G.N.Ling, F.W.Cope: Interntl.Rev.Cytol.26 (1969),1
29. G.N.Ling: Dissertation,Erlangen 1973
30. G.Menges: Phys.Chem.,Thieme Verl.,
Stuttgart (1970)
31. E.A.Moelwyn-Hughes:

32. R.Morris, R.D.Wright: Austral.J.Exptl.Biol.Med.
Sci.32 (1954),669
33. G.M.Mrevlishvili,
P.L.Privalov: in L.P.Kayushin(Ed.),"Water
i.Biol.Syst.",übers.a.d.Russ.
Consult.Bureau,N.Y.(1968),p.63
34. R.Müller: persönliche Mitteilungen
35. J.L.Oncley: in E.J.Cohn,J.T.Edsall:
"Prot.Amino Acids and Pept.
as Ions and Dipol.Ions",Rein-
hold Publ.Comp.N.Y.(1943),p.543
36. H.Pauly: "Thermodynam.u.elekt.r.Eigensch.
d.Zytopl."in W.Beier(Ed.):
"Fortschr.d.exp.u.theor.Bio-
phys.",Thieme,Leipzig
Nature,183 (1959),333
37. H.Pauly: ONR Techn.Rep.28 (1959),Univ.
of Pennsylv.,Electromed.Lab.,
The Moore School of Electr.
Engineering
38. H.Pauly,H.P.schwan: Biophys.1 (1963),143
39. H.Pauly: Biophys.J.6 (1966),621
40. H.Pauly, H.P.Schwan: in W.Beier(Ed.):"Phys.Grundl.
d.Med.;Abhdlgn.a.d.Biophys.",
Heft 7,Ed.Leipzig (1967),p.85
41. H.Pauly: Biophys.10,7-32 (1973)
42. H.Pauly: unveröffentl.Ergebnisse
43. M.Peuten: Dissertation,Erlangen 1971
44. H.Pfister: Diplomarbeit,Frankfurt 1963
45. H.Pfister: Z.Naturf.25b (1970),1130
46. H.Pfister: J.Polym.Sci.C,No.39 (1972),
pp.179-189
47. H.Pfister, H.Pauly: Dissertation,Erlangen 1976
48. D.Rämisch:

49. H.Rau: Persönliche Mitteilungen
50. M.D.Reboiras, "Activ.Coeffic.of Salts in
H.Pfister, H.Pauly: Highly Concentr.Prot.Solut.
I-Alkali Chlorids i.Isoionic
Bovine Serum Albumin Solut.?"
Biophys.Chem.i.Druck
51. D.Rosen: Trans.Farad.Soc.59 (1963),1211
52. O.Y.Samoilov: "Struct.of aqueous Solut.on
the Hydrat,of Ion",author.
Transl.from the Russ.by D.J.G.
Janz,Consult.Bureau,N.Y.(1965)
53. G.Scatchard: J.Amer.Chem.Soc.75 (1953),2883
54. G.Scatchard: i.Shedlovsky(Ed.):"Electrochem.
i.Biol.a.Med.",J.Wiley&Sons,
N.Y.(1955),p.18
55. W.H.Schmid: Dissertation,Erlangen 1976
56. K.Sollner: Ann.N.Y.Acad.Sci.148 (1968),154
57. J.Steinhardt, "Multiple Equilib.i.Prot.",
J.A.Reynolds: Acad.Press,N.Y.a.London (1969)
p.214ff.316ff
58. A.S.Tombalakian, J.Phys.Chem.70 (1966),3711
W.F.Graydon:
59. A.S.Tombalakian: J.Phys.Chem.72 (1968),1566
60. N.Tretter: Dissertation,Erlangen 1975
61. A.S.Troschin: "Probl.of Cell Permeab.",
Pergamon Press Oxford (1966)

Herrn Prof.Dr.Dr.H.Pauly danke ich für die Überlassung des Themas, die materielle Unterstützung und die hervorragenden Arbeitsbedingungen im Institut.

Mein Dank gilt besonders Herrn Dr.Pfister, der durch seine Geduld und Hilfsbereitschaft sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für ihre Hilfe und das gute Arbeitsklima.

An dieser Stelle danke ich auch meinen Eltern, die mir eine entsprechende Schulbildung und das Studium der Zahnmedizin ermöglichten.

Lebenslauf

Ich, Max-Emanuel Bauer wurde am 2. November 1947 als Sohn des Frauenarztes Dr. Max Bauer und seiner Frau Elisabeth, geborene Wohlwend in Augsburg geboren.

Von 1954 bis 1958 besuchte ich die Volksschule in Hechendorf und München. 1958 trat ich in das Maximiliansgymnasium in München ein. Ab 1960 war ich Schüler des Werdenfels-Gymnasiums in Garmisch-Partenkirchen. 1962 wechselte ich auf das Gymnasium St. Stephan in Augsburg. Ab 1965 besuchte ich wieder das Werdenfels-Gymnasium in Garmisch-Partenkirchen, wo ich 1968 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1968/69 studierte ich an der Universität München Naturwissenschaften, im Sommersemester 1969 begann ich an der Universität Erlangen-Nürnberg mit dem Studium der Zahnmedizin, wo ich am 16. Juli 1974 die zahnärztliche Prüfung bestand.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990